Aus dem
Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn

Vitalitätsstudien und enzymcytochemische Untersuchungen an nativen und kultivierten menschlichen Fruchtwasserzellen

---

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von:
Jürgen Mende

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem
Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn

Vitalitätsstudien und enzymcytochemische Untersuchungen an nativen und kultivierten menschlichen Fruchtwasserzellen

---

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von:
Jürgen Mende

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. G. Röhrborn

Korreferent
gez.: Prof. Dr. L. Beck

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1.	Material	3
2.1.1.	Fruchtwasserproben	3
2.1.2.	Native menschliche Fruchtwasserzellen	4
2.1.3.	Zellklone in der Fruchtwasserzellkultur	4
2.2.	Methoden	5
2.2.1.	Mikropräparationstechnik	5
2.2.2.	In vitro Kultivierung von Fruchtwasserzellen	6
2.2.3.	Vitalitätsuntersuchungen	6
2.2.3.a)	Färbetechnik	6
2.2.3.b)	Vitalitätsuntersuchungen an nativen und kultivierten Fruchtwasserzellen	7
2.2.4.	Enzymcytochemische Nachweise an nativen und kultivierten Fruchtwasserzellen	8
2.2.4.a)	Mg^{2+} ATPase	8
2.2.4.b)	Cytochromoxidase	10
3.	ERGEBNISSE	13
3.1.	Statistische Vorüberlegungen	13
3.2.	Untersuchungen an Fruchtwasserzellen vor der in vitro Kultivierung	14
3.2.1.	Häufigkeit und Vitalität der morphologisch unterschiedlichen Zelltypen im nativen Fruchtwasser	14

3.2.2. Vitalität von Fruchtwasserzellen nach Aufbewahrung bei verschiedenen Temperaturen 15

3.2.3. Vitalität nativer Fruchtwasserzellen nach der Zentrifugation 16

3.3. Untersuchungen an Fruchtwasserzellen im Verlauf einer 7-tägigen in vitro Kultivierung 17

3.3.1. Vitalitätsanalysen an Fruchtwasserzellen 17

3.3.2. Enzymcytochemische Nachweise an Fruchtwasserzellen 18

3.3.2.a) Mg^{2+} ATPase 18

3.3.2.b) Cytochromoxidase 20

4. DISKUSSION 22

5. ZUSAMMENFASSUNG 45

6. LITERATURVERZEICHNIS 47

7. ANHANG (Tabellen und Abbildungen) 58

1. EINLEITUNG

Voraussetzung zur pränatalen Diagnostik zahlreicher fetaler Erkrankungen ist die in vitro Kultivierung menschlicher Fruchtwasserzellen. Langjährige Erfahrungen mit Zellkulturen verschiedener Spezies sind die Grundlage der heute in der Pränataldiagnostik üblichen Zellkulturtechniken. Erste Versuche an isolierten, lebenden Flimmerepithelzellen der menschlichen Trachea führte Rudolf VIRCHOW schon im Jahre 1858 durch. Dem Amerikaner HARRISON gelang 1907 die erste erfolgreiche Gewebekultur: aus isolierten Fragmenten des Medullarrohres von Froschembryonen sproßten nach in vitro Kultivierung in Froschlymphe marklose Nervenfasern aus. Neue Erfahrungen und ständige Verbesserungen der Zellkulturtechnik in den folgenden Jahrzehnten ermöglichten STEELE & BREG 1966 die erste erfolgreiche Kultivierung menschlicher Fruchtwasserzellen. Während jedoch STEELE & BREG in nur 19 % der Kulturen Zellwachstum beobachteten, beträgt die Erfolgsrate heute über 90 % (HASHOLT 1976). Diese Erfolge wurden durch Verbesserung der Amniozentesetechnik und vor allem durch günstigere Kulturbedingungen für die Fruchtwasserzellen ermöglicht. Speziell die strenge Auswahl fetaler Kälberseren mit optimal wachstumsfördernden Eigenschaften hat sich in diesem Zusammenhang bewährt.

Während die cytogenetischen und biochemischen Techniken zur Diagnose genetisch bedingter Erkrankungen aus Fruchtwasserzellen ständig verbessert wurden, ist die Zuordnung der Fruchtwasserzellen zu bestimmten fetalen Geweben noch nicht eindeutig möglich. Vergleichende morphologische Untersuchungen lassen als möglichen Ursprung der Fruchtwasserzellen das Amnion, das Nabelschnurepithel, die fetale Epidermis, die Epithelien der Mundhöhle, der Vagina und des harnableitenden Systems sowie die Schleimhäute der Atemwege und des

Gastrointestinaltrakts vermuten (BISHOP & POLLOCK 1970, CASADEI et al 1973, CHALUPA & HORKY 1977, CHIGBUH 1973, FLOYD et al 1969, HAFEZ et al 1977, HOEHN et al 1975, HOYES 1968, HUISJES 1970, LIND et al 1969, LIND 1972, NELSON 1973, OTA 1973, PRIEST et al 1978, SHAW & MARRIOTT 1949, SUTHERLAND & BAIN 1972, SUTHERLAND et al 1974, VAN LEEUWEN et al 1965, VOTTA et al 1968, WACHTEL et al 1969).

Auch über mögliche Veränderungen der Fruchtwasserzellen unter Kulturbedingungen liegen nur wenige Befunde vor. So ist zum Beispiel wenig über die Vitalität und Stoffwechselaktivität von Fruchtwasserzellen in der Zellkultur bekannt. Weiterhin sind über die Fähigkeit verschiedener Fruchtwasserzelltypen zum klonalen Wachstum keine eindeutigen Aussagen möglich. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb versucht werden, Vorstellungen über die Aktivität zweier Enzyme (Mg^{2+} ATPase, Cytochromoxidase) in nativen und kultivierten Fruchtwasserzellen sowie über die Vitalität dieser Zellen zu erarbeiten. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt daher auf enzymcytochemischen Untersuchungen und Vitalitätsanalysen an Fruchtwasserzellen vor und während einer 7-tägigen in vitro Kultivierung. Daneben wurde der Einfluß der zur Kultivierung notwendigen Vorbehandlung der Fruchtwasserzellen (Aufbewahrung, Zentrifugation) auf die Vitalität dieser Zellen untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Fruchtwasserproben

Alle untersuchten Fruchtwasserproben wurden in der Frühschwangerschaft durch Amniozentese gewonnen. 56 Fruchtwasserproben wurden vom Institut für Humangenetik der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt, 2 Fruchtwasserproben vom Institut für Humangenetik in Bonn.
Zur pränatalen Diagnose fetaler genetischer Erkrankungen (CLAUSSEN et al 1978, DFG-STUDIE München 1979 1981 1982, GEBAUER 1978, NADLER & GERBIE 1971, SCHMIDT 1973) wird Fruchtwasser mit einer Hohlnadel unter Ultraschallsicht transabdominal entnommen. Nach etwa 3-wöchiger Kultivierung (s. 2.2.2.) stehen die Fruchtwasserzellen zur Analyse des X- und Y-Chromatins (Kerngeschlecht), des Karyotyps (Chromosomenaberrationen) und für biochemische Untersuchungen (Stoffwechseldefekte) zur Verfügung. Zusätzlich kann im zellfreien, nativen Fruchtwasser die Konzentration von α-Fetoprotein zur Diagnostik offener Neuralrohrdefekte untersucht werden.

Aus methodischen Gründen wurden nur Fruchtwasserproben ausgewählt, die bei einem Mindestvolumen von 3 ml und einer ausreichenden Zellkonzentration keine makroskopische Blutkontamination aufwiesen. Auch eine weitgehende Einheitlichkeit hinsichtlich der Schwangerschaftswoche (SSW) war erforderlich. Von den 58 untersuchten Fruchtwasserproben stammen 47 Proben aus der 16. und 17. SSW, 5 Proben wurden in der 15. SSW, 4 Proben in der 18. SSW und je eine Probe in der 20. bzw. 21. SSW gewonnen.

2.1.2. Native menschliche Fruchtwasserzellen

Um eine morphologische Bewertung der Fruchtwasserzellen zu erleichtern, wurde eine Einteilung in 6 Zelltypen vorgenommen (Tab. 1). Diese Einteilung sollte eine präzise und schnelle Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop ermöglichen. Die gewählte Klassifizierung in 6 Zelltypen beruht auf den Befunden verschiedener Autoren (BISHOP & POLLOCK 1970, CASADEI et al 1973, FLOYD et al 1969, HOYES 1968, HUISJES 1970, LIND et al 1969, VAN LEEUWEN et al 1965, VOTTA et al 1968, WACHTEL et al 1969).
Die in Tab. 1 in der Spalte "Morphologie" durch Kästchen gekennzeichneten Bezeichnungen beziehen sich auf die Einteilung von BISHOP & POLLOCK 1970 und FLOYD et al 1969 und werden in der Diskussion im einzelnen behandelt.

2.1.3. Zellklone in der Fruchtwasserzellkultur

Kultiviert man native Fruchtwasserzellen unter geeigneten Bedingungen, so läßt sich bereits nach etwa einer Woche klonales Wachstum beobachten. Zur morphologischen Differenzierung dieser am Boden des Kulturgefäßes im Monolayer wachsenden Zellen diente eine vereinfachte Einteilung (Tab. 2). Sie stützt sich auf Befunde von HOEHN et al 1974, HOEHN et al 1975, SUTHERLAND et al 1974 und VAN DER VEER et al 1978.

2.2. Methoden

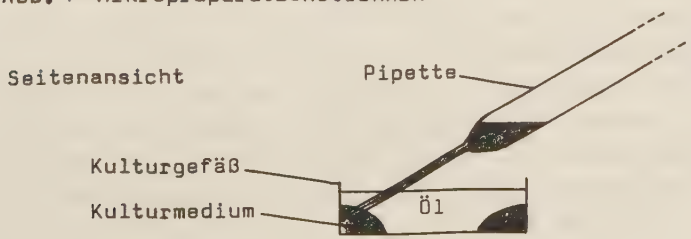
2.2.1. Mikropräparationstechnik

Da nur geringe Mengen an Fruchtwasser (3 - 6 ml) zur Verfügung standen, mußte eine Methode gewählt werden, die Analysen an kleinen Zellmengen zuläßt. Hier bot sich die Kultivierung der Zellen unter nichttoxischem Paraffinöl an (ANSELL 1975). Diese Methode, die sich bei der Kultur früher Embryonalstadien bewährt hat, bietet den Vorteil, daß Zellkultivierung, Vitalitäts- und Enzymanalysen nacheinander im selben Kulturgefäß unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden können.

Runde Plastikpetrischälchen (35 · 10 mm) werden mit etwa 3 ml Paraffinöl gefüllt. Die Zellsuspension wird an zwei gegenüberliegenden Stellen des Gefäßrandes als Tropfen (ca. 0,15 ml) unter das Paraffinöl gegeben. Das Paraffinöl bedeckt den Tropfen vollständig, erlaubt jedoch einen Gasaustausch. Der Austausch von Kulturmedien erfolgt mittels einer Glasmikropipette unter optischer Kontrolle durch eine Stereolupe (Abb. 1).

Durch diese Technik waren alle für diese Arbeit erforderlichen Versuche gut reproduzierbar durchzuführen. Dennoch ist für die Mikropräparationstechnik ein großer präparativer und zeitlicher Aufwand erforderlich. Dies gilt besonders für die Versuche zur Kultivierung von Fruchtwasserzellen und die arbeitsintensiven Enzymnachweise. Schon aus diesen Gründen konnten nicht beliebig viele Fruchtwässer untersucht werden.

Abb. 1 Mikropräparationstechnik



2.2.2. In vitro Kultivierung von Fruchtwasserzellen

26 Fruchtwasserproben wurden unter Verwendung der beschriebenen Mikropräparationstechnik (s. 2.2.1.) kultiviert.
3 - 6 ml natives Fruchtwasser wurden in graduierten Kunststoffzentrifugenröhrchen bei 600 U/min (≙ 57g) für 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in HAMS - F 10 - Medium (Flow Laboratories) mit 20 % fetalem Kälberserum (Flow Lab.), 60 µg/ml Streptomycin (Flow Lab.), 60 E/ml Penicillin (Flow Lab.) und 80 µg/ml L - Glutamin (Flow Lab.) suspendiert. Zur Kultivierung wurde das jeweilige Fruchtwasser dem Medium in einer Konzentration von 40 % beigemischt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in beschichteten Gewebekulturplastikschälchen (Falcon, 35 · 10 mm) unter nichttoxischem Paraffinöl (Fisher) für 7 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit.

2.2.3. Vitalitätsuntersuchungen

2.2.3.a) Färbetechnik

Zur Vitalitätsanalyse wurden die Fruchtwasserzellen für 10 min bei + 20°C mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau (0,5 % in physiolog. NaCl, Flow Lab.) inkubiert. Anschließend wurde 6 mal mit 0,9 % NaCl gewässert (GOSDEN & BROCK 1978, MERCHANT et al 1960, STEELE & BREG 1966, WAHLSTRÖM et al 1970, WAHLSTRÖM 1974).

Die Auswertung erfolgte durch Beurteilung von 100 Fruchtwasserzellen pro Zellkultur unter dem Umkehrmikroskop bei 240-facher Vergrößerung. Aus den Einzelergebnissen wurde das arithmetische Mittel $\bar{x}$ und die Standardabweichung s_x berechnet. Getrennt davon wurden alle angewachsenen Solitärzellen und Klone in der Zellkultur beurteilt. Zellen, die den blauen Farbstoff aufgenommen hatten, galten als nicht vital, ungefärbte Zellen als vital (Abb. 12,13).

2.2.3.b) Vitalitätsuntersuchungen an nativen und kultivierten Fruchtwasserzellen

Um den Einfluß unterschiedlicher Behandlung der Fruchtwasserzellen vor der Kultivierung auf die Vitalität zu untersuchen, mußten Versuche zur Aufbewahrung und Zentrifugation durchgeführt werden.
Zunächst wurden 13 Fruchtwasserproben nach einer Zentrifugation mit 1500 U/min (≙ 358 g) unter Verwendung der Mikropräparationstechnik in Plastikpetrischalen (35 · 10 mm, Falcon) unter nichttoxischem Paraffinöl (Fisher) aufbewahrt. Die Vitalität der Fruchtwasserzellen wurde vor der Lagerung und nach Aufbewahrung über 24 h und 48 h bei 4°C, 20°C und 37°C bestimmt.
Zusätzlich wurde die Vitalität nativer Fruchtwasserzellen in unzentrifugiertem Zustand (n = 8) und nach Zentrifugation mit 600 U/min (≙ 57 g) für 10 min (n = 12) sowie mit 1500 U/min (≙ 358 g) für 10 min (n = 23) bestimmt.

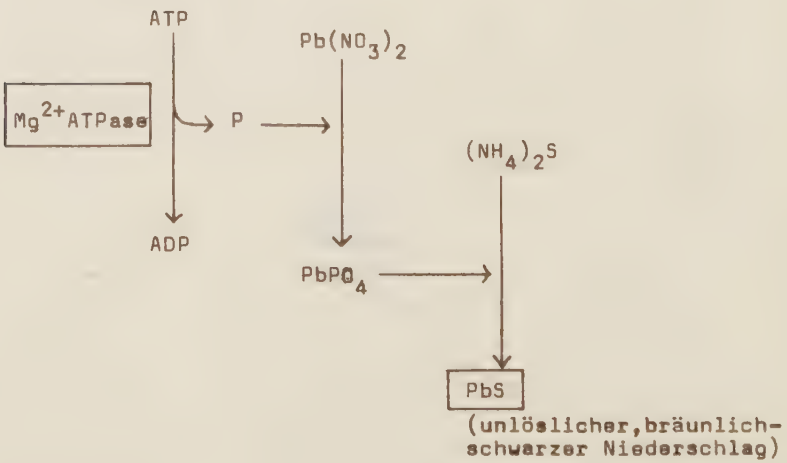
Nach diesen Voruntersuchungen konnten Vitalitätsuntersuchungen an kultivierten Fruchtwasserzellen durchgeführt werden. Die Zellen wurden im Nativzustand (n = 26) sowie in 24-stündigen Intervallen bis zum 7. Tag der Kultivierung mit Trypanblau gefärbt. Diese Nachweise wurden ebenso wie die enzymcytochemischen Nachweise mit Hilfe der Mikropräparationstechnik direkt im Kulturgefäß durchgeführt.

2.2.4. Enzymcytochemische Nachweise an nativen und kultivierten Fruchtwasserzellen

2.2.4.a) Mg^{2+} ATPase

Für Hinweise über Stoffwechselaktivitäten der Fruchtwasserzellen waren enzymcytochemische Methoden notwendig, die eine Zuordnung von Enzymaktivitäten zu einzelnen Zellen bzw. Zellgruppen ermöglichen. Der Nachweis der mitrochondrialen, cristaeständigen Mg^{2+} ATPase erfolgte nach der Methode von WACHSTEIN & MEISEL (1957, 1963, 1964) (GEYER 1973, PEARSE 1968), die den Fruchtwasserzellen entsprechend modifiziert wurde. ATPasen katalysieren die Reaktion von ATP zu ADP unter Abspaltung von Phosphat. Beim cytochemischen Nachweis überführt dieser Phosphatrest $Pb(NO_3)_2$ in $PbPO_4$, das zur lichtmikroskopischen Bewertung mittels $(NH_4)_2S$ spezifisch nachgewiesen wird (Abb. 2).

Abb. 2 Reaktionsschema zum Mg^{2+} ATPase - Nachweis



Cytochemische Darstellung der Mg^{2+} ATPase

1. Fixierung (HÜNDGEN 1968)

4 % Formaldehyd (aus Paraformaldehyd durch Depolimerisation frisch hergestellt) in 0,1 mol/l Trismaleatpuffer (pH 7,4); 30 min, 4°C

2. Wässerung

8,3 % Saccharose in 0,1 mol/l Trismaleatpuffer (pH 7,0) 20°C, 6 x 10 min

3. Inkubation (nach WACHSTEIN & MEISEL 1957)

Herstellung des Inkubationsgemisches:
Lösung A: 24,2 mg ATP·Na_2 + 98,6 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ in 37,6 ml Wässerungslösung, pH 7,0
Lösung B: 46,4 mg $Pb(NO_3)_2$ in 2,4 ml Wässerungslösung, filtrieren
Lösung B tropfenweise der Lösung A zugeben, über Nacht bei 20°C stehen lassen und die Trübung über einen 0,2 µm Membranfilter abfiltrieren, pH 7,0
Vorinkubation: 10 min mit Lösung A, pH 7,0
Inkubation : 3 h bei 20°C, pH 7,0

4. Wässerung

Wie unter Punkt 2 beschrieben

5. Kontrastierung

$(NH_4)_2S$, 1 %, in Wässerungslösung, 3 min

6. Wässerung

Aqua bidest, 10 min

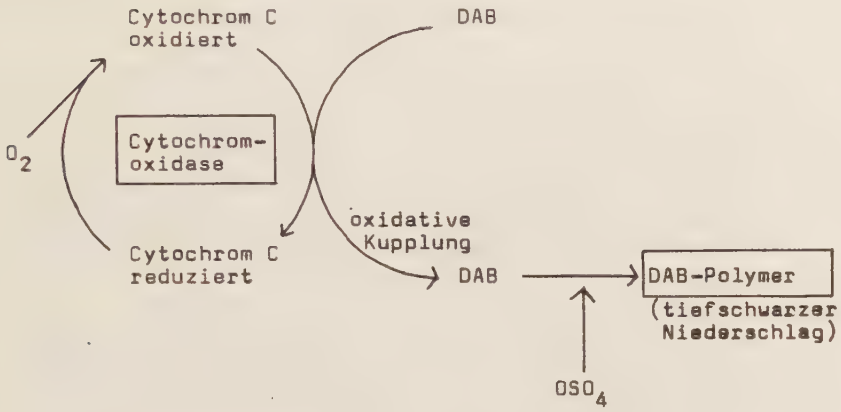
Der enzymcytochemische Nachweis wurde an nativen Fruchtwasserzellen (n = 13 Fruchtwasserproben) und während der Kultivierung in 24-stündigen Intervallen bis zum 7. Tag durchgeführt.

2.2.4.b) Cytochromoxidase

Die Cytochromoxidase ist an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert und gehört zu den eisenhaltigen Oxidasen (GEYER 1973, KALINA & PEARSE 1970, SELIGMAN & PLAPINGER 1970, SELIGMAN et al 1968). Sie steht als letztes Enzym der Cytochromreihe am Ende der Atmungskette. Die Cytochromoxidase kann direkt mit molekularem Sauerstoff reagieren und katalysiert die Oxidation des Cytochrom C.

Zum Nachweis wurde die Methode nach SELIGMAN (1968, 1970) gewählt (Abb. 3). Cytochrom C kann von verschiedenen aromatischen Aminen wie Diaminobenzidin (DAB) reduziert werden. Durch oxidative Kupplung bilden die Amine dann am Reaktionsort unlösliche Pigmente. DAB ergibt unter den Bedingungen des Cytochromoxidasenachweises ein amorphes, osmiophiles Reaktionsprodukt, das in Wasser und organischen Solventien unlöslich ist. Durch Osmiumtetroxid (OSO_4) wird es schnell in ein schwarzes, elektronendichtes Polymer umgewandelt. Da der Vorrat an oxidiertem Cytochrom C im Gewebe beschränkt ist, findet die Reaktion nur statt, wenn das reduzierte Cytochrom C durch die Cytochromoxidase ständig wieder oxidiert wird. Die Farbstoffbildung ist also ein Maß für die Aktivität der Cytochromoxidase. Um den Nachweis von Peroxidase auszuschließen, wurde dem Inkubationsmedium Katalase zugesetzt (ANDERSON 1970, ANDERSON et al 1975).

Abb. 3 Reaktionsschema zum Cytochromoxidasenachweis



Cytochemische Darstellung der Cytochromoxidase

(modifiziert nach SELIGMAN, 1968, 1970)

1. Fixierung

4 % Formaldehyd (aus Paraformaldehyd durch Depolimerisation frisch hergestellt) in 0,1 mol/l Trismaleatpuffer (pH 7,4); 30 min, 4°C

2. Wässerung

7,5 % Saccharose in 0,05 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,4) 20°C, 6 x 10 min

3. Inkubation

Herstellung des Inkubationsgemisches:

3,3'Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	5 mg
Cytochrom C Typ II	10 mg
Wässerungslösung, pH 7,4	9 ml

Inkubation: 60 min bei 37°C, pH 7,4

4. Wässerung

Wie unter Punkt 2 beschrieben

5. Osmierung

OSO_4 1 %, 10 min bei Dunkelheit, 4°C

6. Wässerung

Aqua bidest, 10 min

Der enzymcytochemische Nachweis wurde an nativen Fruchtwasserzellen (n = 13 Fruchtwasserproben) und im Verlauf der Kultivierung in 24-stündigen Intervallen bis zum 7. Tag durchgeführt.
Die Auswertung der enzymcytochemischen Nachweise erfolgte durch Beurteilung von 100 Fruchtwasserzellen pro Zellkultur unter dem Umkehrmikroskop (Fa. Leitz, mit Orthomat-Kamera) bei 240-facher Vergrößerung.
Aus den Einzelwerten wurde das arithmetische Mittel $\bar{x}$ und die Standardabweichung s_x berechnet. Getrennt davon wurden alle angewachsenen Solitärzellen und Klone in der Kultur berücksichtigt. Um eine relative Bewertung der Enzymaktivitäten zu ermöglichen, wurden schwache, mittlere und starke Reaktionen unterschieden.
Als Filmnegativmaterial wurde der panchromatische Film Technical Pan SO 115 (Kodak) verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Statistische Vorüberlegungen

Aus den Einzelergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Fruchtwasserzellen (Häufigkeit der Zelltypen, Vitalität, Enzymaktivität) wurde jeweils der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s_x berechnet. Bei den verschiedenen Analysen sogar unterschiedlicher Fruchtwasserproben der selben Schwangerschaftswoche ergaben sich Werte, die noch stark außerhalb der einfachen Standardabweichung s_x streuten. In den meisten Fällen ergaben sich Variationskoeffizienten ($CV = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100$) über 50 %. Wegen dieser biologisch bedingten Inhomogenität der statistischen Masse können selbst bei großem Stichprobenumfang keine statistisch gesicherten Ergebnisse, sondern nur tendenzielle Befunde erwartet werden.

Wegen der geringen Häufigkeit der Zelltypen 4, 5 und 6 und der großen Streuung der Einzelwerte bei der Untersuchung dieser Zelltypen wurde in den meisten Abbildungen auf eine graphische Darstellung dieser Zelltypen verzichtet.

In allen Diagrammen stellen die vertikalen, begrenzten Striche die einfache Standardabweichung s_x ober- und unterhalb des durch einen Punkt gekennzeichneten Mittelwertes $\bar{x}$ dar.

3.2. Untersuchungen an Fruchtwasserzellen vor der in vitro Kultivierung

3.2.1. Häufigkeit und Vitalität der morphologisch unterschiedlichen Zelltypen im nativen Fruchtwasser

Bevor Einflüsse auf Fruchtwasserzellen vor und während einer in vitro Kultivierung überprüft werden konnten, waren Werte über die prozentuale Verteilung der 6 unterschiedlichen Fruchtwasserzelltypen (2.1.2.) und deren Vitalität im Nativzustand erforderlich.
Bei n = 50 nativen Fruchtwässern, die überwiegend aus der 16. und 17. Schwangerschaftswoche stammten (2.1.1.), wurde die prozentuale Häufigkeit der Zelltypen bestimmt. Von diesen Fruchtwasserproben wurden n = 8 Fruchtwässer ohne vorausgehende Zentrifugation unmittelbar nach der Amniozentese auf die Vitalität der Zelltypen mit Hilfe der Trypanblaumethode (2.2.3.) untersucht. In Abb. 10 ist die durchschnittliche Häufigkeit der Zelltypen dargestellt. Auffallend ist, daß die Zelltypen 1 und 2 zusammen durchschnittlich über 80 % der Fruchtwasserzellen stellen. Dagegen sind die Zelltypen 3 und 4 vergleichsweise seltener und die Zelltypen 5 und 6 nur gelegentlich anzutreffen.

Die Färbung der nativen, unzentrifugierten Fruchtwasserzellen mit Trypanblau zeigt für die Zelltypen 1 und 2 eine hohe Vitalität (Abb. 11,12), während die übrigen Zelltypen nur selten vital sind. Insgesamt sind durchschnittlich 83,7 % aller nativen, unzentrifugierten Fruchtwasserzellen vital.

Auch beim Vergleich von Häufigkeit (Abb. 10) und Vitalität (Abb. 11) der Zelltypen fällt auf, daß die Zelltypen 1 und 2 wesentlich häufiger vital sind als die übrigen Zelltypen. Etwa 75 % der Zellen des Typ 2 und alle Zellen des Typ 1 sind vital (Abb. 11,12).

Bedingt durch die relativ hohen Standardabweichungen liegt die Anzahl vitaler Zellen des Typ 1 über dessen durchschnittlicher Häufigkeit. Trotzdem kann nach den vorliegenden Ergebnissen angenommen werden, daß die Zelltypen 1 und 2 die meisten vitalen Zellen im nativen Fruchtwasser stellen.

3.2.2. Vitalität von Fruchtwasserzellen nach Aufbewahrung bei verschiedenen Temperaturen

Für die Kultivierung nativer Fruchtwasserzellen sind Vorbehandlungen wie Aufbewahrung und Zentrifugation erforderlich. Die Überprüfung des Einflusses dieser Maßnahmen auf die zelluläre Vitalität war notwendige Voraussetzung für weiterführende Versuche.

So wurden native Fruchtwasserproben (n = 13) über 24 h und 48 h bei Temperaturen von 4°C, 20°C und 37°C gelagert und die Fruchtwasserzellen anschließend mit Trypanblau gefärbt (2.2.3.). Abbildung 14 zeigt, daß die Vitalität aller Fruchtwasserzellen mit längerer Lagerungsdauer und höherer Lagerungstemperatur abnimmt. Die durchschnittliche Vitalität der Fruchtwasserzellen vor der Aufbewahrung beträgt 70 %. Nach 2-tägiger Lagerung bei 4°C liegt die Vitalität bei 52 %, während nur 46 % der Zellen bei 20°C und nur 43 % bei 37°C überleben. Bemerkenswert ist, daß die Zelltypen 1 und 2 nach einer 2-tägigen Lagerung bei 4°C keinen großen Vitalitätsverlust zeigen. Dagegen sind unabhängig von der Lagerungstemperatur nach 2 Tagen nur noch sehr wenige vitale Zellen der Typen 3, 4, 5 und 6 zu finden. Allerdings liegt die prozentuale Häufigkeit der Zelltypen 4, 5 und 6 sehr niedrig, so daß auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde.

3.2.3. Vitalität nativer Fruchtwasserzellen nach der Zentrifugation

In Vorversuchen zu dieser Arbeit hatten sich Hinweise auf den Einfluß verschiedener Zentrifugationsgeschwindigkeiten auf die Vitalität der Fruchtwasserzellen ergeben. Daher wurden native Fruchtwasserzellen nach 10-minütiger Zentrifugation bei 600 U/min (≙ 57 g ; n = 12) und 1500 U/min (≙ 358 g ; n = 23) mit Trypanblau gefärbt (2.2.3.).

Die Ergebnisse sprechen für eine Vitalitätsabnahme und für eine mechanische Schädigung der Fruchtwasserzellen durch eine Zentrifugation. Dies wird besonders bei Zentrifugation mit 1500 U/min deutlich. Von den Zellen des Typ 1 sind nach Zentrifugation mit 1500 U/min im Vergleich zum Nativzustand nur noch etwa die Hälfte vital (Abb. 15). Beim Zelltyp 2 scheint die Vitalitätsabnahme durch Zentrifugation nicht so hoch zu sein (Abb. 15). Über die Zelltypen 3, 4, 5 und 6 ist angesichts des geringen Vorkommens und der hohen Standardabweichung keine verläßliche Aussage möglich. Sie wurden deshalb in Abbildung 15 nicht dargestellt.
Für eine Vitalitätsabnahme und eine mechanische Schädigung der Fruchtwasserzellen durch Zentrifugation spricht ebenfalls das vermehrte Auftreten von trypanblaugefärbten Zelltrümmern. Diese besonders nach Zentrifugation mit 1500 U/min zu beobachtenden Zelltrümmer waren im unzentrifugierten Fruchtwasser nicht nachzuweisen.
Bei der Berechnung der Vitalität (Abb. 15) wurden dagegen nur Zellen berücksichtigt, die nach lichtmikroskopischen Kriterien intakt waren.

3.3. Untersuchungen an Fruchtwasserzellen im Verlauf einer 7-tägigen in vitro Kultivierung

3.3.1. Vitalitätsanalysen an Fruchtwasserzellen

Bei n = 26 Fruchtwasserproben wurde die Vitalität der Fruchtwasserzellen vor und während einer 7-tägigen in vitro Kultivierung in Intervallen von 24 h bestimmt (2.2.3.). Die von mir gewählten Kulturbedingungen waren im methodischen Ansatz mit denen der routinemäßigen Pränataldiagnostik vergleichbar (2.2.2.). In diesen über 7 Tage untersuchten Kulturen zeigte sich die Gesamtzahl der lebensfähigen Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer verringert (Abb. 16). Besonders groß ist der Vitalitätsverlust während der ersten 48 h der Kultivierung. Während zu Beginn der Kultivierung durchschnittlich 70 % aller Zellen vital sind, sind es nach 48 h noch durchschnittlich 43 % und nach 7 Tagen nur noch durchschnittlich 29 % (Abb. 16). Trotz der relativ großen Streuung der Einzelwerte ist der Vitalitätsverlust während der ersten 2 bis 3 Tage der Kultivierung auffallend.

Bewertet man diese Ergebnisse getrennt nach den einzelnen Zelltypen, so fällt auf, daß die Vitalität der Zelltypen 3 und 4 im Verlauf der Kultivierung verhältnismäßig stark abfällt. Nach 7 Tagen sind nur noch 2 % der Fruchtwasserzellen vitale Zellen des Typ 3 und 0,5 % vitale Zellen des Typ 4 (Abb. 16). Für die Zelltypen 5 und 6 ist eine klare Aussage wegen der bereits im nativen Fruchtwasser geringen Häufigkeit (beide um 1 %, Abb. 10) nicht möglich. Auf eine Darstellung in Abbildung 16 wurde daher verzichtet. Im Gegensatz zu den Zelltypen 3 und 4 verringert sich die anfänglich sehr hohe Vitalität der Zelltypen 1 und 2 deutlich nur bis zum dritten Tag der Kultivierung, um danach etwa auf gleicher Höhe zu bleiben (Abb. 16).

Nach 7 Tagen ist noch etwa die Hälfte der ursprünglich vitalen Zellen trypanblau-negativ, d.h. vital. Nach einwöchiger Zellkultivierung sind also überwiegend nur noch Fruchtwasserzellen der Typen 1 und 2 vital, während die übrigen Zelltypen kaum noch vitale Zellen stellen.

3.3.2. Enzymcytochemische Nachweise an Fruchtwasserzellen

3.3.2.a) Mg^{2+} ATPase

Um weitere Aussagen über die Stoffwechselaktivität der Fruchtwasserzellen im Verlauf der Kultivierung zu erhalten, wurden ergänzend zu den Trypanblauversuchen enzymcytochemische Untersuchungen durchgeführt (2.2.4.). In Abbildung 17 wurden die Ergebnisse aus Abbildung 16 in abgeänderter Form übernommen, um einen Vergleich der Diagramme zu erleichtern.

Bei der Untersuchung von n = 13 Fruchtwasserproben zeigte sich, daß fast ausschließlich Zellen der Typen 1 und 2 eine Aktivität der Mg^{2+}-abhängigen ATPase aufweisen (Abb. 17, Abb. 18, 19, 20). Andere Zelltypen waren vergleichsweise so selten enzymatisch aktiv, daß sie in Abbildung 17 nicht berücksichtigt wurden. Während die Vitalität im Verlauf der Kultivierung durchschnittlich zwischen 70 % und 29 % liegt (Abb. 17), zeigen nur durchschnittlich 5 % bis 8 % aller Fruchtwasserzellen ATPase - Aktivität (Abb. 17). Diese enzymatisch aktiven Zellen sind überwiegend Zellen des Typ 1. Der Zelltyp 2 ist dagegen weitaus seltener ATPase - aktiv (Abb. 17). Das bestätigt sich auch, wenn man den jeweiligen Anteil der enzymatisch aktiven Zellen an allen Zellen eines Zelltyps berechnet (Tab. 3). Von allen Zellen des Typ 1 weisen etwa 10 % ATPase - Aktivität auf, während nur etwa 2 % aller Zellen des Typ 2 ATPase - aktiv sind.

besteht aber die Interaktion des erzmyelocytomatösen Knochenmarkes, so sind bereits der ersten 2 Tage der Zellkultivierung unterschiedliche Reaktionen der Zellen 1 und 2 zu beobachten. Liegen trotz der ersten Wochen nimmt die Intensität der Reaktionen in Gegenwart der Mg^{2+} -Ionen deutlich zu. Insgesamt sind die Zellen des Typ 1 reaktionsfreudiger eingestuft als die des Zelltyps 2.

Auch die im Vergleich weiteren Zellen in der Fraktionszellmischung (2.1.3.) wurden mikroskopisch einer Prüfung der Effekte unterzogen. Interessanter findet man es am 2. Tag der Kultivierung. Nach dem 4. Tag betrugt die Zahl zumeist 4 bis 6 Initialzellen pro Zellkultur (ca. 11 Initialzellen/ml Frischblutprobe). 20 bis 30 % aller angesiedelten Einzelzellen sind geringfügig differenziert. Die Morphologie der Solitärzellen ist unterschiedlich. Man findet jedoch auch häufig kleine runde Zellen mit zahlreichen Pseudopodienausläufern, die dem Zelltyp 1 morphologisch ähnlich sind (Abb. 23). Diese erwachsenden Zellen, die wie der Zelltyp 1 einzeln oder in Gruppen von bis zu 20 Zellen vorkommen (Abb. 24,21) sind älter und stark differenziert. Für ein frühes Anwachsen von Zellen, die dem Zelltyp 2 oder anderen Zelltypen morphologisch ähnlich sind, ergeben sich keine Hinweise.

Die ersten Typen Klone finden man am 3. Tag in Anwesenheit der Mg^{2+}-Ionen. Hierzu alle Klone bestehen aus 4 - 8 Zellen. Am 7. Tag fällt die Nachweisreaktion insgesamt sehr stark positiv aus.

Granulozytäre und Thrombozytäre Klone treten regelmäßig am 5. Tag auf. Fast alle Erythrozyten Klone (Abb. 22) und alle Thrombozytären Klone sind größer als die Typen Klone (Abb. 23 - 25). Am 7. Tag der Kultivierung bleibt die starke Nachweisreaktion der

fibroblastischen Klone erhalten, während sie bei einigen epithelialen Klonen abgeschwächt ist.

Insgesamt sind am 7. Tag der Zellkultivierung etwa 35 Solitärzellen/ml Fruchtwasser und 10 Klone/ml Fruchtwasser zu beobachten.

3.3.2.b) Cytochromoxidase

Als zweites Enzym des Energiestoffwechsels wurde die Cytochromoxidase im Verlauf der in vitro Kultivierung von Fruchtwasserzellen mit enzymcytochemischen Methoden nachgewiesen (2.2.4.b). Bei der Auswertung von n = 13 Fruchtwasserproben zeigte sich, daß wie bei der Mg^{2+} ATPase fast ausschließlich die Zelltypen 1 und 2 Cytochromoxidase - Aktivität besitzen (Abb. 17). Auf eine Darstellung der Zelltypen 3, 4, 5 und 6 in Abbildung 17 wurde daher verzichtet. Im Vergleich zur ATPase ist der Prozentsatz aller Zellen mit Cytochromoxidase - Aktivität im nativen Fruchtwasser mit durchschnittlich 1,2 % niedriger, steigt jedoch am 4. Tag auf durchschnittlich 13,7 % und am 7. Tag auf durchschnittlich 23,2 % an (Abb. 17). Diese Steigerung der Cytochromoxidase - Aktivität im Verlauf der Kultivierung ist besonders beim Zelltyp 1 deutlich, während der Zelltyp 2 nur einen geringen Teil der enzymatisch aktiven Zellen stellt (Abb. 17).

Der Anteil der enzymatisch aktiven Zellen ist beim Zelltyp 1 höher als beim Zelltyp 2 (Tab. 3). Zwischen 2,1 % (Tag 0) und 41 % (Tag 7) aller Zellen des Typ 1 sind Cytochromoxidase - aktiv, während der Anteil beim Zelltyp 2 zwischen 0,8 % (Tag 0) und 12,4 % (Tag 7) liegt.

Die Intensität der enzymatischen Nachweisreaktionen ist im nativen Fruchtwasser und nach 24 h beim

Zelltyp 1 schwach, beim Zelltyp 2 dagegen stark. Nach dem 2. Tag der Kultivierung zeigt der Zelltyp 1 starke bis sehr starke Nachweisreaktionen,während der Zelltyp 2 kontrastarm angefärbt ist.

Auf die Zahl der angewachsenen Solitärzellen und Klone wurde bereits unter 3.3.2.a) eingegangen. Zu Beginn der Kultivierung zeigen alle Solitärzellen Cytochrom-oxidase - Aktivität. Im Gegensatz zur ATPase sinkt der Anteil bis zum 6. Tag auf 23 % der Solitärzellen. Nach 7-tägiger Kultivierung weisen dann erneut 95 % der Solitärzellen Cytochromoxidase - Aktivität auf. Bei den fibroblastischen Solitärzellen fallen die Enzymnachweise überwiegend schwach positiv aus. Die Solitärzellen, die morphologisch dem Zelltyp 1 ähnlich sind, besitzen eine hohe Cytochromoxidase - Aktivität (Abb. 21,22).

Bei allen frühen Klonen, die ab dem 3. Tag zu beobachten sind, läßt sich schwache bis starke Enzymaktivität nachweisen (Abb. 25). Epitheliale Klone weisen zu 100 % starke bis sehr starke Aktivität auf, während der Nachweis bei fast allen fibroblastischen Klonen überwiegend schwach positiv ausfällt.

4. DISKUSSION

Die in vitro Kultivierung durch Amniozentese gewonnener menschlicher Fruchtwasserzellen ermöglicht heute die pränatale Diagnostik zahlreicher fetaler Erkrankungen. Die dabei verwendeten Kulturtechniken sind in allen Labors für Pränataldiagnostik sehr ähnlich. Ausreichende Kenntnisse über die Zytologie und den Stoffwechsel der Fruchtwasserzellen während der frühen in vitro Kultivierung liegen bisher nicht vor. Untersuchungen hierzu ergänzen nicht nur das Grundlagenwissen, sondern können nicht zuletzt auch zu einer Verbesserung der Kultivierungstechniken führen.

Da die Fruchtwasserzellen morphologisch sehr heterogen sind, ist als Voraussetzung für eine wissenschaftliche Untersuchung zunächst die Klassifizierung dieser Zellen erforderlich. Eine solche Einteilung soll einerseits die reproduzierbare Einordnung aller Fruchtwasserzellen ermöglichen und andererseits eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen anderer Autoren gewährleisten.

Die Fruchtwasserzellen wurden bisher nach unterschiedlichem Wachstumsverhalten in der Zellkultur und nach ihrer Morphologie eingeteilt. HOEHN et al (1978) unterscheiden drei Gruppen von Fruchtwasserzellen: schnell, spät oder nicht am Boden des Kulturgefäßes anwachsende Zellen. Bei dieser Einteilung ist jedoch keine Aussage darüber möglich, ob die Fähigkeit zur Klonbildung auf bestimmte morphologisch unterscheidbare Zelltypen beschränkt ist. Auf die Morphologie sollte deshalb als Kriterium der Einteilung von Fruchtwasserzellen nicht verzichtet werden.

Die in Tabelle 1 definierte morphologische Klassifizierung der Fruchtwasserzellen orientiert sich an Arbeiten mehrerer Autoren (BISHOP & POLLOCK 1970,

CASADEI et al 1973, FLOYD et al 1969, HUISJES 1970, LIND et al 1969, VOTTA et al 1968, WACHTEL et al 1969), die übereinstimmend 4 unterschiedliche Zelltypen im menschlichen Fruchtwasser beschreiben. Grundsätzlich kann man kernhaltige und kernlose Zellen unterscheiden. Zelltyp 1 (Tab. 1; Abb. 4a) ist eine kleine runde Zelle mit großer Kern/Plasma - Relation und kann einzeln (Abb. 4a) oder in Gruppen (Abb. 4b, 4c) auftreten. Zelltyp 2 ist größer als Zelltyp 1, polygonal oder ovoid mit etwas kleinerem, vesikulärem Kern (Tab. 1; Abb. 5). Den größten Zelldurchmesser weist der Zelltyp 3 auf. Er ist polygonal oder zylindrisch und besitzt einen pyknotischen Kern (Tab. 1; Abb. 6). Der Zelltyp 4 ist kernlos oder läßt allenfalls noch Kerntrümmer erkennen (Tab. 1; Abb. 7). Seine Morphologie entspricht sonst weitgehend der des Zelltyps 2. Um auch die Einordnung selten vorkommender Fruchtwasserzellen zu ermöglichen,wurde die beschriebene Einteilung um zwei weitere Zelltypen erweitert. Der Zelltyp 5 (Tab. 1; Abb. 8) ist als mosaikartige Anordnung polyedrischer Zellen und der Zelltyp 6 (Tab. 1; Abb. 9) als unregelmäßige Anordnung von Zellen mit unscharfen Zellgrenzen definiert. Diese Zelltypen werden nur bei CASADEI et al (1973) beschrieben. In die gewählte morphologische Einteilung in 6 Zelltypen lassen sich alle Fruchtwasserzellen schnell und sicher einordnen.

BISHOP & POLLOCK (1970) und FLOYD et al (1969) haben versucht, die Fruchtwasserzellen in Analogie zur klinisch gebräuchlichen Klassifizierung der Vaginalepithelien einzuteilen. Sie beschreiben "parabasale" Zellen (entsprechen dem Fruchtwasserzelltyp 1), "intermediäre" Zellen (entsprechen dem Zelltyp 2), "precornified cells", "cornified cells" (entsprechen dem Zelltyp 3) und kernlose Zellen (entsprechen dem Zelltyp 4). Diese Einteilung läßt an die Möglichkeit

denken, daß die morphologisch unterschiedlichen Fruchtwasserzellen ebenso wie die Vaginalepithelzellen verschiedene Differenzierungsstufen gleichartiger Zellen sind. Somit wären alle Fruchtwasserzellen als morphologische Abkömmlinge des parabasalen Zelltyps anzusehen.

Für die pränatale Diagnostik von Stoffwechselstörungen mit Hilfe von Fruchtwasserzellen wären genauere Kenntnisse über Ursprung und klonales Wachstum dieser Zellen wünschenswert. Alle bisherigen Untersuchungen hierzu gehen von morphologischen Übereinstimmungen zwischen Zellen fetaler Gewebe und Fruchtwasserzellen aus. HOYES (1968) und VAN LEEUWEN et al (1965) beschreiben den Zelltyp 1 als "amnial" und die Zelltypen 2, 3 und 4 als "fetal".

Diese Einteilung bestätigt sich jedoch nach neueren elektronenmikroskopischen Ergebnissen von HAFEZ et al (1977), LUDWIG et al (1974) und VAN HERENDAEL et al (1978) nicht. Die Zellmembran des Zelltyp 1 ist mit zahlreichen kurzen villösen Fortsätzen, Microplicae und Bläschen ("blebs") besetzt (HAFEZ et al 1977). Ähnlich wird von VAN HERENDAEL et al (1978) die Ultrastruktur der Epithelzellen des Amnion reflectum beschrieben. Das placentare Amnion ist dagegen ein zylindrisches Epithel mit apikalen Kernen (VAN HERENDAEL et al 1978). Seine Zellen ähneln eher dem Fruchtwasserzelltyp 2. Andererseits besitzt der Zelltyp 2 zahlreiche Microvilli und reichlich Glycogen (HOYES 1968), wie man es auch bei Zellen des fetalen Periderm findet (HOLBROOK 1979, BUXMAN et al 1979). Lichtmikroskopisch lassen sich diese Peridermzellen eher dem Zelltyp 1 zuordnen, da beide Zellen eine kleine runde Form haben. Die Zelltypen 3 und 4 ähneln dem Nabelschnuramnion. Es ist ein 3- bis 4-schichtiges Plattenepithel, dessen obere, flache Zellen keinen oder nur einen pyknotischen

Kern besitzen. Der Zelltyp 5 könnte ebenfalls vom Nabelschnuramnion abgeleitet sein, während es für die Herkunft des sehr selten vorkommenden Zelltyps 6 noch keine konkreten Anhaltspunkte gibt. Endgültige Vorstellungen über die Herkunft der Fruchtwasserzelltypen konnten bisher trotz der genannten morphologischen Untersuchungen noch nicht erarbeitet werden.

Daher halte ich es für geeigneter, an der gewählten morphologischen Einteilung der Fruchtwasserzellen in 6 Zelltypen festzuhalten, nicht zuletzt, um eine gute Vergleichbarkeit mit anderen Autoren zu gewährleisten.

Die Beurteilung von Vitalitäts- und Enzymanalysen an Fruchtwasserzellen machte eine einleitende Untersuchung der prozentualen Verteilung dieser 6 Fruchtwasserzelltypen als Ausgangswert notwendig. Aus bisher vorliegenden Arbeiten weiß man, daß Konzentration, Verteilung und Vitalität der Fruchtwasserzellen in hohem Maße von der Schwangerschaftswoche (SSW) abhängig sind. Erst ab der 16. SSW findet man mit 10000 bis 20000 Zellen/ml Fruchtwasser eine für die Zellkultivierung ausreichende Zellkonzentration (GOSDEN & BROCK 1978, HAHNEMANN 1972, WAHLSTRÖM et al 1970, WAHLSTRÖM 1974). Weiterhin nimmt mit fortschreitender Schwangerschaftswoche der Anteil des Zelltyps 1 ab, während der Anteil der Zelltypen 3 und 4 zunimmt (BISHOP & POLLOCK 1970, FLOYD et al 1969). Schließlich nimmt offenbar der Prozentsatz vitaler Fruchtwasserzellen mit der Dauer der Schwangerschaft ab (GOSDEN & BROCK 1978, HAHNEMANN 1972, NADLER 1972, NELSON & EMERY 1970, STEELE & BREG 1966, WAHLSTRÖM et al 1970). Um die Interpretation der Vitalitäts- und Enzymanalysen nicht zu erschweren, wurden aus den genannten Gründen soweit möglich Fruchtwasserproben der 16./17. SSW (2.1.1.) untersucht. Alle Fruchtwässer wurden im Rahmen der Routinediagnostik unter gleichen Bedingungen gewonnen.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Zelltyp 1 mit durchschnittlich 44 % aller Fruchtwasserzellen am häufigsten vorkommt (Abb. 10). Ähnlich häufig ist der Zelltyp 2 vertreten. Die Zelltypen 1 und 2 stellen also mit durchschnittlich 81 % die Mehrzahl der Fruchtwasserzellen. Die Zelltypen 3 und 4 findet man regelmäßig im Fruchtwasser, während die Zelltypen 5 und 6 nur selten zu beobachten sind (Abb. 10).

Zwischen den einzelnen Fruchtwasserproben läßt sich eine starke Variabilität bezüglich Zellkonzentration und Zellverteilung feststellen. Das gilt auch für Fruchtwässer der selben Schwangerschaftswoche. Auch in der Literatur werden diese großen Unterschiede zwischen einzelnen Fruchtwässern wiederholt beschrieben (GOSDEN & BROCK 1978, HAHNEMANN 1972, WAHLSTRÖM et al 1970, WAHLSTRÖM 1974). Das bedeutet, daß Zellkonzentration und prozentuale Häufigkeit der einzelnen Zelltypen im Einzelfall erheblich vom errechneten Mittelwert abweichen können. Das gilt auch für die Untersuchungen zur Vitalität und Enzymaktivität von Fruchtwasserzellen. Bei allen untersuchten Fruchtwässern sind jedoch die Zelltypen 1 und 2 weitaus am häufigsten vertreten, während die Zelltypen 5 und 6 sehr selten vorkommen. Trotz der großen Standardabweichung erscheint daher die Berechnung des Mittelwertes als ein Parameter, der vergleichende Aussagen zuläßt, gerechtfertigt.

Naheliegend ist, daß Zellkonzentration und Zellverteilung im Fruchtwasser von den Bedingungen der Amniozentese beeinflußt werden können (BONSNES 1972, WAHLSTRÖM et al 1970, WAHLSTRÖM 1974). Hier ist an den Einfluß der Punktionsstelle, der Bewegung von Mutter und Fetus und der Körperlage der Mutter zu denken. Andere Ursachen könnten in individuellen Eigenschaften von Fetus, Amnion oder Fruchtwasser liegen.

Ähnliche Untersuchungen zur Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen im Fruchtwasser haben FLOYD et al (1969) durchgeführt. Allerdings wurden in ihrer Arbeit nur Fruchtwasserproben der 20. Schwangerschaftswoche untersucht und zusätzlich ein weiterer Zelltyp ("precornified") definiert, der nach meiner Einteilung einer Übergangsform zwischen Zelltyp 2 und 3 entspricht. Berücksichtigt man diesen zusätzlichen Zelltyp, ist die Häufigkeit des Zelltyps 3 bei FLOYD et al etwa gleich groß wie bei meinen Untersuchungen. Dagegen liegt der Anteil der kernlosen Zellen (Typ 4) bei FLOYD et al mit 51 % etwa 7 mal höher, während die Zelltypen 1 und 2 bei diesen Autoren nur etwa halb so häufig vorkommen. Die Ursache für diese Unterschiede in der Verteilung der Zelltypen könnte in dem um 3 bis 4 Wochen späteren Punktionstermin der von FLOYD et al untersuchten Fruchtwässer liegen. Sowohl FLOYD et al als auch BISHOP & POLLOCK (1970) konnten nachweisen, daß mit fortschreitender Schwangerschaftswoche der Anteil des Zelltyps 4 zunimmt, während der des Zelltyps 1 abnimmt. Darüber hinaus ist an alle anderen bereits genannten Faktoren zu denken, die sich auf die Verteilung der Fruchtwasserzellen auswirken.

Die Ergebnisse zur Häufigkeit der 6 verschiedenen Zelltypen im Fruchtwasser sollten als Ausgangswert für weitere Untersuchungen dienen. Sie sagen aber wenig aus über Vitalität und Stoffwechsel der Fruchtwasserzellen im nativen Fruchtwasser und während der Zellkultivierung.

Verglichen mit der Kultivierung adulten Gewebes bereitet die Kultivierung von fetaler Epidermis, von Gewebeproben innerer Organe des Feten sowie selbst von diffusen Abortresten nur selten Schwierigkeiten. Dagegen zeigte sich schon bei den ersten Versuchen der

Kultivierung menschlicher Fruchtwasserzellen, daß nur sehr wenige Zellen Kontakt mit dem Boden des Kulturgefäßes aufnehmen und Klone bilden (STEELE & BREG 1966).

Voraussetzungen für die Fähigkeit von Fruchtwasserzellen, Klone zu bilden, sind neben der Teilungsfähigkeit dieser Zellen sicher auch Vitalität und ausreichende Stoffwechselaktivität. Ein einfacher Test zur Überprüfung der Vitalität von Zellen ist die Färbung mit Vitalfarbstoffen wie Trypanblau. Lebende Zellen nehmen den blauen Farbstoff nicht über ihre Zellmembran auf und sind somit von den blau gefärbten, toten Zellen zu unterscheiden. Die Trypanblaufärbung läßt sich auf Klone und frei schwimmende Fruchtwasserzellen direkt im Kulturgefäß in situ anwenden. Artefakte durch Entfernung der Zellen aus dem Kulturmilieu vor der Färbung können so vermieden werden.

Als alternative Methode der Vitalitätsanalyse schlagen MERCHANT et al (1960) die Auszählung der aus der Kultur hervorgehenden Klone vor. Diese Technik geht von der Annahme aus, daß aus jeder vitalen Zelle ein Klon entsteht. Es liegen jedoch Befunde vor, nach denen die Vitalität von Zellen im nativen Fruchtwasser nicht mit der Klonbildungsrate korreliert (NELSON 1973). Entscheidend ist aber, daß diese Methode nicht die für meine Untersuchungen erforderliche Unterscheidung von Zelltypen zuläßt. Die Autoradiographie als eine weitere Technik der Vitalitätsuntersuchung erfüllt zwar diese Bedingung, ist aber für Reihenuntersuchungen zu aufwendig.

Bei der für die Aufgabenstellung meiner Arbeit am besten geeigneten Trypanblaumethode sind allerdings technisch bedingte Fehlerquellen sorgfältig auszuschließen und bei der Wertung der Ergebnisse gegebenenfalls zu berücksichtigen. Insbesondere sind Fehler durch subjektive Bewertung der Farbstoffkonzentration

in der Zelle, durch falsche Färbezeit und Farbstoffkonzentration möglich. Ich habe versucht, diese Fehlerquellen durch günstige Bedingungen am Umkehrmikroskop sowie konstante Versuchsbedingungen auszuschalten.

Nach meinen Untersuchungen sind 83,7 % aller Zellen im nativen Fruchtwasser der 16./17. Schwangerschaftswoche vital nach den Kriterien der Trypanblaumethode (3.2.1.; Abb. 11). Dieser Wert liegt höher als bei ähnlichen Untersuchungen anderer Autoren an Fruchtwässern der gleichen Schwangerschaftswoche. Beispielsweise fanden NELSON et al (1970, 1973) 11 % und NADLER (1969) 70 % vitale Zellen im Fruchtwasser. Beim Vergleich dieser Ergebnisse muß auch die Schwangerschaftswoche, aus der die Fruchtwässer stammen, berücksichtigt werden, weil der Prozentsatz vitaler Zellen mit der Dauer der Schwangerschaft abnimmt (GOSDEN & BROCK 1978, HAHNEMANN 1972, NADLER 1972, NELSON & EMERY 1970, STEELE & BREG 1966, WAHLSTRÖM et al 1970).

Fragt man nach den Gründen für diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen verschiedener Vitalitätsuntersuchungen, muß man auch an methodisch bedingte Fehler denken. Aus Arbeiten von BLACK & BERENBAUM (1964), HANKS & WALLACE (1958), STEELE & BREG (1966) und WAHLSTRÖM et al (1970) ist bekannt, daß die Steigerung der Vitalfarbstoffkonzentration und die Verlängerung der Färbezeit zu einer vermehrten Anfärbung der Zellen führen kann. Dadurch können erniedrigte Vitalitätswerte ermittelt werden. Obwohl bei den Vitalitätsuntersuchungen dieser Arbeit eine höhere Farbstoffkonzentration und eine längere Färbezeit als bei anderen Autoren (GOSDEN & BROCK 1978, HAHNEMANN 1972, WAHLSTRÖM et al 1970) angewandt wurde, sind dennoch nicht mehr, sondern weniger Zellen angefärbt. Insgesamt läßt sich beim Vergleich mit allen Arbeiten (GOSDEN & BROCK 1978, HAHNEMANN 1972, NELSON 1973,

STEELE & BREG 1966, WAHLSTRÖM et al 1970) keine Korrelation zwischen Farbstoffkonzentration und Färbezeit einerseits und Vitalitätsrate andererseits feststellen.

Ein Grund für die niedrigere Vitalitätsrate in den genannten Veröffentlichungen scheint mir auf Grund meiner Ergebnisse eher in der unterschiedlichen Vorbehandlung der Fruchtwasserzellen vor dem Vitalitätstest zu liegen. Während für meine Untersuchungen unbehandelte, native Fruchtwasserzellen eingesetzt wurden, benutzt HAHNEMANN (1972), der 48 % vitale Fruchtwasserzellen findet, für 10 min bei 210 g zentrifugierte Zellen. Auch WAHLSTRÖM et al (1970) führten ihre Vitalitätstests an Fruchtwasserzellen durch, die vorher bei 500 U/min zentrifugiert worden waren. Ungünstige mechanische Einflüsse durch die Zentrifugation könnten die Ursache für einen erhöhten Anteil toter Zellen im Fruchtwasser sein. BLACK & BERENBAUM (1964) fanden bei mechanisch geschädigten Zellen eine beträchtliche Zunahme der Anfärbung mit Vitalfarbstoff während der ersten 30 bis 40 min der Färbung. Unbeschädigte Zellen zeigten dagegen keine vermehrte Anfärbung. Auch STEELE & BREG (1966) halten eine Schädigung der Fruchtwasserzellen durch Zentrifugation für möglich und folgern daraus, daß die Zahl der vitalen Fruchtwasserzellen möglicherweise höher liegt, als ihre Ergebnisse es andeuten.

Angesichts der hohen Vitalitätsrate von 83,7 % bei meinen Untersuchungen könnte man fragen, ob die Trypanblaumethode eine ausreichende Genauigkeit besitzt. Für die Spezifität und Genauigkeit dieser Technik spricht jedoch, daß die Vitalitätsraten im Einzelfall zwischen 100 % im nativen Fruchtwasser und 0 % nach 7-tägiger in vitro Kultivierung liegen können. Bei gleichen Versuchsbedingungen zeigen Zellen derselben Fruchtwasserprobe im Verlauf der Kultivierung deutliche Vitalitätsabnahmen (3.3.1.).

Zwischen den einzelnen Fruchtwasserproben gibt es große Unterschiede in der Vitalitätsrate der Zellen. Berücksichtigt man, daß die Zelltypen 1 und 2 durchschnittlich 81 % aller Fruchtwasserzellen ausmachen, so wirken sich Unterschiede der Häufigkeit und Vitalität dieser beiden Zelltypen stark auf die Gesamtvitalität aus. Auch in der Literatur finden sich diese Unterschiede zwischen den einzelnen Fruchtwasserproben bestätigt (GOSDEN & BROCK 1978, HAHNEMANN 1972, NELSON & EMERY 1970, WAHLSTRÖM et al 1970). Beispielsweise geben WAHLSTRÖM et al bei einem Mittelwert von 22 % vitalen Fruchtwasserzellen der 16./17. Schwangerschaftswoche Extremwerte von 3 % bis 67 % an. Diese großen Unterschiede in der Vitalitätsrate von Fruchtwasserzellen sind also generell eine typische Eigenschaft aller untersuchten Fruchtwasserproben. Sie erschweren eine Interpretation der Ergebnisse, da dadurch die Standardabweichung in fast allen Fällen groß ist (3.1.).

Unterscheidet man die Vitalität der einzelnen Fruchtwasserzelltypen, so fällt die sehr hohe Vitalität der Zelltypen 1 und 2 auf (Abb. 11, 3.2.1.). Dagegen sind alle anderen Zelltypen nur selten vital. Auch VALENTI & KEHATY (1969) beschreiben Zellen, die dem Zelltyp 3 entsprechen und nicht vital sind. Die Vitalität ist sicher neben anderen Faktoren Voraussetzung für die Teilungsfähigkeit einer Zelle. Deshalb könnte man vermuten, daß besonders die Zelltypen 1 und 2 an der Klonbildung in der Zellkultur beteiligt sind.

Um ungünstige Einflüsse auf die untersuchten Fruchtwasserzellen möglichst auszuschließen, untersuchte ich die Vitalität nach einer bis zu 2-tägigen Aufbewahrung der Fruchtwasserzellen bei verschiedenen Temperaturen. In der Praxis werden Fruchtwasserproben

falls erforderlich verschickt oder gelagert, bis eine Kultur angesetzt werden kann. Viele Autoren berichten über eine erfolgreiche Fruchtwasserzellkultur nach Aufbewahrung des Fruchtwassers über mehrere Tage (CONSCIENCE et al 1972) oder eine Woche (NELSON 1973). Allerdings ist der Prozentsatz der erfolgreichen Kulturen um so geringer, je länger das Fruchtwasser vor dem Ansetzen der Kultur aufbewahrt wurde (DALLAIRE et al 1975). Als Lagerungs- oder Transporttemperatur wählen manche Autoren Zimmertemperatur (CONSCIENCE et al 1973, HAHNEMANN 1972, STEELE & BREG 1966, THERKELSEN 1976), während andere 4°C als geeignete Temperatur empfehlen (DALLAIRE et al 1975, GREENE et al 1973, NELSON 1973, WAHLSTRÖM et al 1970). Es stellt sich daher auch die Frage nach dem Einfluß verschiedener Lagerungsdauer und -temperatur auf die Fruchtwasserzellen selber. Mit der Trypanblaumethode kann die Vitalität der einzelnen Fruchtwasserzelltypen getrennt bestimmt werden. Die Lagerungsdauer wurde auf maximal 2 Tage begrenzt, da diese Zeitspanne unter Praxisbedingungen selten überschritten wird.

Grundsätzlich zeigt sich bei den durchgeführten Untersuchungen, daß die Vitalität aller Fruchtwasserzellen mit zunehmender Lagerungsdauer und höherer Lagerungstemperatur abnimmt (3.2.2.; Abb. 14). Der geringste Vitalitätsverlust scheint bei einer Lagerungstemperatur von 4°C einzutreten. Die Vitalitätsabnahme nach Aufbewahrung der Fruchtwasserzellen bei 20°C entspricht Ergebnissen von STEELE & BREG (1966), die zwischen dem 1. und 3. Tag der Lagerung des Fruchtwassers bei 25°C ebenfalls eine Vitalitätsabnahme von 35 % des Ausgangswertes feststellten.

Bemerkenswert ist, daß Fruchtwasserproben mit einem hohen Anteil der Zelltypen 1 und 2 nach der Lagerung mehr vitale Zellen aufweisen als andere Fruchtwasserproben, weil die Zelltypen 1 und 2 nach Lagerung bei

4°C im Gegensatz zu den anderen 4 Zelltypen keinen nennenswerten Vitalitätsverlust zeigen. Geht man nach allen Ergebnissen dieser Arbeit davon aus, daß nur die Zelltypen 1 und 2 als klonbildende Zellen in Frage kommen, ist das lange Überleben dieser Zelltypen während der Aufbewahrung von besonderer Bedeutung für den Kulturerfolg. Das könnte auch erklären, daß noch nach 45-tägiger Lagerung von Fruchtwasser bei 4°C in 19 % der Fälle Kulturerfolge erzielt werden konnten (DALLAIRE et al 1975).

Wegen des Vitalitätsverlustes bei einer Aufbewahrung von Fruchtwasserzellen wurden die Zellen möglichst unmittelbar nach der Amniozentese kultiviert. Falls in Einzelfällen erforderlich, erfolgte eine Lagerung des Fruchtwassers bei 4°C.

Da zur Fruchtwasserzellkultivierung nur geringe Fruchtwassermengen zur Verfügung standen, war über den Einsatz der Mikromethode hinaus (2.2.1.) eine Zentrifugation des Fruchtwassers erforderlich. Aus dem Vergleich der Ergebnisse eigener Vitalitätsanalysen an nativen Fruchtwasserzellen (3.2.1.) mit denen anderer Autoren ergaben sich jedoch bereits Hinweise auf einen Vitalitätsverlust durch Zentrifugation. In der Literatur werden für die Zentrifugation von Fruchtwasserzellen Werte zwischen 25 g (PEAKMAN et al 1977) und 1000 g (HULTBERG 1976) empfohlen bei einer Zentrifugationsdauer zwischen 5 und 10 min. DAVIDSON (1974) vermutet, daß selbst schonende Zentrifugation lebende Zellen zerstört, die sonst eine Zellkolonie gebildet hätten. Bisher liegen jedoch keine vergleichenden Vitalitätsuntersuchungen an nativen und zentrifugierten Fruchtwasserzellen vor.

Die hierzu durchgeführten eigenen Untersuchungen mit Hilfe der Trypanblaumethode geben deutliche Hinweise,

daß die Vitalität der Fruchtwasserzellen durch eine Zentrifugation herabgesetzt wird (3.2.3.; Abb. 15). Bei Zentrifugation mit 1500 U/min (≙ 358 g) findet man mehr trypanblaupositive, d.h. tote Zellen und Zelltrümmer als bei 600 U/min (≙ 57 g). Mechanische Schädigung als Ursache der Vitalitätsabnahme ist daher wahrscheinlich. Auffallend ist, daß die Abnahme der Gesamtvitalität hauptsächlich auf eine Abnahme der Vitalität des Zelltyps 1 zurückzuführen ist (Abb. 15). Während im nativen Fruchtwasser noch fast alle Zellen des Typs 1 vital sind, sind es nach Zentrifugation mit 1500 U/min nur noch etwa die Hälfte (Abb. 15). Bei 600 U/min ist die Schädigung des Zelltyps 1 dagegen geringer. Der Zelltyp 2 scheint vergleichsweise weniger empfindlich gegen die Einflüsse einer Zentrifugation zu sein.

Diese Ergebnisse können auch im Zusammenhang mit Befunden anderer Autoren (DAVIDSON 1974, KNOERR - GÄRTNER & HAERLE 1972, MARCHANT 1971, NELSON 1973, THERKELSEN 1976) gesehen werden, wonach der Kulturerfolg ohne vorherige Zentrifugation der Fruchtwasserzellen besser ist. Da eine Anreicherung der Fruchtwasserzellen vor der Kultivierung wegen der nur geringen Fruchtwassermengen unumgänglich war, wurde unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse eine schonende Zentrifugation bei 600 U/min gewählt. So konnte eine mechanische Schädigung, besonders des Zelltyps 1, gering gehalten werden.

Wenn die Vitalität der Fruchtwasserzellen mit der Fähigkeit zum klonalen Wachstum verbunden wäre, müßte man bei der hohen Vitalität nativer Fruchtwasserzellen von 83,7 % mit einer ähnlich hohen Klonhäufigkeit rechnen. Aus ca. 20000 Zellen/ml Fruchtwasser entstehen jedoch nur etwa 10 Klone (eigene Ergebnisse: 3.3.2.a, NELSON 1973). Schon diese kurze Überlegung macht deutlich,

daß neben der Grundvoraussetzung der Vitalität noch andere Kriterien für die Klonbildungsfähigkeit einer Zelle wichtig sein müssen.

Während der frühen in vitro Kultivierung menschlicher Fruchtwasserzellen findet ein erstes Anwachsen von Zellen und das Wachstum von Klonen statt. Genaue Kenntnisse über diese Phase der Zellkultivierung, zu der bisher wenige Untersuchungen vorliegen, sind in zweifacher Hinsicht von Bedeutung. Zum einen wäre zu klären, welche der 6 Zelltypen in der Zellkultur klonbildend sind, d.h. ob die zur pränatalen Diagnostik benutzten Zellen aus einem bestimmten Zelltyp hervorgehen. Zum anderen könnten für die klonbildenden Zellen günstige Kulturbedingungen gewählt werden, um so die Kultivierungszeit zu verkürzen und den Kulturerfolg zu verbessern.

Das Wachstumsverhalten der Fruchtwasserzellen in der Kultur ist von Vitalität und Stoffwechselleistung der Zellen abhängig. Da bei der Trypanblaumethode nur die Zellmembranpermeabilität das Kriterium ist, bietet sich zum Nachweis der Stoffwechselaktivität der Nachweis von Enzymen des Energiestoffwechsels an. Im Rahmen dieser Arbeit kam es besonders auf die Zuordnung der Enzymaktivität zu bestimmten Zelltypen an und weniger auf die exakte Quantifizierung der Enzymaktivität. Deshalb wurden enzymcytochemische Verfahren gewählt, die eine topographisch genaue Enzymlokalisation zulassen.

Für die enzymatischen Untersuchungen wurden als Enzyme des Energiestoffwechsels die Mg^{2+} -abhängige ATPase und die Cytochromoxidase gewählt. Die Versuchsbedingungen ermöglichten dabei die gleichzeitige Durchführung von Vitalitäts- und Enzymuntersuchungen während der ersten 7 Tage der Kultivierung. Der Mg^{2+} ATPase - Komplex, der die Synthese und Hydrolyse

von ATP katalysiert, ist in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert. Er stellt bei Bedarf durch den Auf- und Abbau eines Protonengradienten Energie bereit (FIRTH 1978).

Die Cytochromoxidase befindet sich ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran. Die Reaktion Cytochrom C - Oxidase/Sauerstoff kontrolliert die mitochondriale Atmung (ERECINSKA & WILSON 1978). Die Aktivität der Cytochromoxidase als letztes Enzym der Cytochromreihe am Ende der Atmungskette stellt somit ein Maß für die oxidative Stoffwechsellage einer Zelle dar (SUN et al 1975). Die Intensität der Nachweisreaktion hängt speziell vom oxidativen Status der inneren Mitochondrienmembran und von der Verfügbarkeit und Konzentration von Elektronenrezeptoren ab (ANDERSON et al 1975). Nach FRANKS & WILSON (1977) ist die Aktivität der Cytochromoxidase ein höchst empfindlicher Indikator für Veränderungen in der Zellkultur.

Die enzymatischen Untersuchungen wurden ebenso wie die Vitalitätsuntersuchungen direkt im Kulturgefäß in der Zellkultur unter gleichen Bedingungen durchgeführt, um so den Vergleich beider Parameter zu ermöglichen. Die Kulturbedingungen wurden so gewählt, daß sie vom Ansatz her den Zellzuchtverfahren in der Routinediagnostik vergleichbar sind.

Die Vitalitätsanalysen an Fruchtwasserzellen während der ersten 7 Tage der in vitro Kultivierung (3.3.1.; Abb. 16, 17) zeigen, daß während dieser Zeit eine Selektion gegen die Zelltypen 3, 4, 5 und 6 stattfindet. Diese Selektion führt dazu, daß am Ende der ersten Woche fast ausschließlich noch Zellen der Typen 1 und 2 vital sind (Abb. 16). Dieser deutliche Vitalitätsverlust der Fruchtwasserzellen im Verlauf der Kultivierung könnte auf ein Anwachsen von Zellen am Boden des Kulturgefäßes zurückzuführen sein.

Dagegen spricht jedoch, daß zum einen die Vitalitätsabnahme um den Faktor 10^3 größer ist als die Zunahme der am Boden angewachsenen Zellen. Zum anderen wird diese Vitalitätsabnahme von einer entsprechenden Zunahme der nicht vitalen Zellen begleitet.

Die Selektion gegen die Zelltypen 3, 4, 5 und 6, die während der ersten 48 h am größten ist, dürfte vielmehr dadurch verursacht werden, daß diese Zelltypen unter den herrschenden Kulturbedingungen nicht überleben können. Offensichtlich ist nur den Zelltypen 1 und 2 ein Überleben in größerem Ausmaß möglich. Es ist bekannt, daß differenzierte Epithelzellen, als die man auch die Zelltypen 3, 5 und 6 bezeichnen kann, oder kernlose Zellen wie der Zelltyp 4 nicht in vitro überleben, weil ihnen die Fähigkeit zur Anpassung an die Bedingungen der Zellkultur fehlt (FRANKS & WILSON 1977). Undifferenzierte Zellen, die aus differenzierten Formen wie z.B. Herzmuskelzellen hervorgehen, wachsen hingegen sehr gut unter Zellkulturbedingungen (FRANKS & WILSON 1977). Der Zelltyp 1 ("parabasal") stellt auch nach FLOYD et al (1969) und BISHOP & POLLOCK (1970) die am wenigsten differenzierte Form der Fruchtwasserzellen dar. Die Zelltypen 3 ("cornified") und 4 ("anucleate") sind demnach als stärker differenzierte Zellen zu werten.

Es ist daher denkbar, daß dem am wenigsten differenzierten Zelltyp 1 die beste Anpassung an die Kulturbedingungen gelingt. Das gilt mit Einschränkung auch für den Zelltyp 2. Den höher differenzierten Zelltypen 3, 4 und 5 und dem eher degenerativen Zelltyp 6 wären dann nur noch verminderte Stoffwechselleistungen und Anpassung an die Zellkulturbedingungen möglich. Dafür spricht auf Grund der eigenen Ergebnisse, daß die zunächst noch vorhandene Vitalität der Zelltypen 3, 4, 5 und 6 im Verlauf der Kultivierung deutlich abnimmt (Abb. 16).

Da offensichtlich vorwiegend die Zelltypen 1 und 2 unter Kulturbedingungen überleben, wäre denkbar, daß diesen Zellen größere Stoffwechselleistungen möglich sind. Tatsächlich weisen fast ausschließlich die Zelltypen 1 und 2 während der ersten Woche der Kultivierung neben der hohen Vitalität auch Aktivität der Mg^{2+} ATPase (3.3.2.a; Abb. 17, 18, 19, 20) und Cytochromoxidase auf (3.3.2.b; Abb. 17). Bei den anderen Zelltypen konnte bis auf sehr wenige Ausnahmen nie eine Aktivität dieser Enzyme nachgewiesen werden, obwohl ein gewisser Prozentsatz dieser Zellen noch vital ist (Abb. 16, 17).

Diese selektive Nachweisreaktion bei beiden Enzymen widerspricht schließlich auch der Möglichkeit unspezifischer Reaktionen bei den Enzymnachweisen. So wäre bei der Darstellung der Mg^{2+} ATPase mit Hilfe der WACHSTEIN/MEISEL - Methode an eine Spontanhydrolyse von ATP zu denken (GEYER 1973, HÜNDGEN 1977, KOENIG & VIAL 1973, PEARSE 1968, ZIMMERMANN 1977). Die hierzu von mir durchgeführten Kontrolluntersuchungen bestätigen die Spezifität beider Enzymnachweise. Bei der Fixierung der Fruchtwasserzellen wurden auch Arbeiten von HÜNDGEN (1968) berücksichtigt, so daß optimale Strukturerhaltung der nachzuweisenden mitochondrialen Enzyme bei größtmöglicher Enzymschonung gewährleistet war.

Vergleicht man Vitalität und enzymatische Aktivität der Zelltypen 1 und 2, fällt auf, daß wesentlich mehr Zellen vital sind als enzymatisch aktiv (Abb. 17). Besonders deutlich ist diese Diskrepanz im nativen Fruchtwasser, wo alle Zellen des Typs 1 vital sind (Abb. 11), aber nur 2,1 % dieser Zellen Cytochromoxidase - Aktivität zeigen (Abb. 17). Ähnlich ist es beim Zelltyp 2 und bei der ATPase. Da die Aktivität der Cytochromoxidase ein Maß für den oxidativen

Energiestoffwechsel darstellt (SUN et al 1975), und auch die Mg^{2+} ATPase am Energiestoffwechsel beteiligt ist, könnte das bedeuten, daß nur bei einem geringen Teil der vitalen Zellen der Typen 1 und 2 ein intensiver Energiestoffwechsel abläuft.

Vergleicht man die enzymatische Aktivität der Zelltypen 1 und 2, fällt zudem auf, daß der Zelltyp 1 konstant häufiger und intensiver enzymatisch aktiv ist (3.3.2.; Abb. 17). Das ist nur zu einem geringen Teil auf das etwas häufigere Vorkommen des Zelltyps 1 im Fruchtwasser zurückzuführen (Abb. 10). Vielmehr ist auch der Anteil der enzymatisch aktiven Zellen des Typs 1 bei beiden Enzymen während der gesamten ersten Woche der Kultivierung um ein Vielfaches höher als beim Zelltyp 2 (3.3.2.; Tab. 3). Zellen des Typs 1 sind also nicht nur häufiger vital, sondern demnach auch häufiger und intensiver stoffwechselaktiv.

Während der ersten Woche der in vitro Kultivierung verändert sich der Prozentsatz der enzymatisch aktiven Fruchtwasserzellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (3.3.2.; Abb. 17). Die im nativen Fruchtwasser noch sehr geringe zelluläre Aktivität der Cytochromoxidase steigt bis zum 7. Tag bei den Zelltypen 1 und 2 deutlich an (Abb. 17). Die ATPase - Aktivität ist in beiden Zelltypen im nativen Fruchtwasser vergleichsweise höher als die der Cytochromoxidase (Abb. 17). Während der einwöchigen Kultivierung bleibt die Aktivität der ATPase jedoch in etwa konstant. Der Anteil der Cytochromoxidase - aktiven Zellen des Typs 1 an allen Zellen dieses Zelltyps liegt im nativen Fruchtwasser etwa 4 mal niedriger als bei der ATPase (Tab. 3), steigt aber bis zum 7. Tag auf das 20-fache an. Dagegen bleibt dieser Wert bei der ATPase konstant (Tab. 3). Beim Zelltyp 2 zeigt sich im Verlauf der Kultivierung eine Steigerung

des Anteils cytochromoxidaseaktiver Zellen um das 15-fache, bei der ATPase ist dagegen keine Steigerung zu verzeichnen (Tab. 3).

Die bei der Fruchtwasserzellzüchtung verwendete Kulturmethode führt also insgesamt zu deutlichen Selektionsprozessen unter den verschiedenen Zelltypen und differentieller Aktivierung bestimmter Enzyme. Allerdings sind offensichtlich nur die Zelltypen 1 und 2 in der Lage, die Kulturbedingungen (O_2- Angebot, Substratangebot) mit einer enzymatischen Aktivierung zu beantworten. Dem Zelltyp 1 gelingt dies offensichtlich am besten. Die Aktivitätsänderung der Cytochromoxidase ist dabei nach FRANKS & WILSON (1977) ein höchst empfindlicher Indikator für Veränderungen in der Zellkultur.

Tatsächlich geht der Anstieg der Cytochromoxidase - Aktivität am 4. und am 7. Tag (Abb. 17) mit dem vermehrten Auftreten von anwachsenden Einzelzellen bzw. von Klonen einher (3.3.2.a). Alle Solitärzellen sind trypanblaunegativ, d.h. vital und besitzen bis auf wenige Ausnahmen Aktivität der beiden untersuchten Enzyme (3.3.2.; Abb. 21, 22). Bis zum 4. Tag steigt dabei die Zahl der Solitärzellen mit ATPase - Aktivität an, um dann etwa gleich zu bleiben (3.3.2.a). Am 7. Tag zeigt die Zahl der Solitärzellen mit Cytochromoxidase - Aktivität einen deutlichen Anstieg (3.3.2.b). Diese zeitlich abhängigen Unterschiede der enzymatischen Aktivität der Solitärzellen deuten darauf hin, daß die Stoffwechselaktivität dieser anwachsenden Zellen Schwankungen unterworfen ist, möglicherweise in Abhängigkeit von der Phase des Anwachsens oder des Zellzyklus. Klone sind dagegen im untersuchten Zeitraum fast immer enzymatisch aktiv (3.3.2.; Abb. 26), was auf einen intensiven Stoffwechsel hinweist.

Die Morphologie der Solitärzellen ist überwiegend fibroblastisch (3.3.2.a). Kurz nach dem ersten Bodenkontakt zeigen einige dieser Einzelzellen jedoch eine auffallende morphologische Ähnlichkeit mit dem Zelltyp 1 (3.3.2.; Abb. 21, 22, 23, 24, 25). Wie der Zelltyp 1 können diese Zellen einzeln oder in Gruppen auftreten (Abb. 1a, 1b, 1c, Abb. 23, 24, 25). Obwohl der Zelltyp 2 etwa gleich häufig wie der Zelltyp 1 ist, konnten Solitärzellen, die morphologisch anderen Zelltypen entsprechen, nicht beobachtet werden. Die anwachsenden Zellen sind vital und haben hohe Aktivität der ATPase (3.3.2.a) und der Cytochromoxidase (3.3.2.b; Abb. 21, 22), was als Ausdruck eines intensiven Energiestoffwechsels gewertet werden kann. Bei diesen anwachsenden Fruchtwasserzellen, die morphologisch dem Zelltyp 1 entsprechen, fand HOYES (1968) phagozytotische Aktivität und die Fähigkeit zur Zellteilung.

Insgesamt weisen die Vitalitäts- und Enzymuntersuchungen sowie Morphologievergleiche darauf hin, daß der Zelltyp 1 in der Fruchtwasserzellkultur die Fähigkeit zur Klonbildung besitzt. Andererseits sprechen die vorliegenden Befunde gegen eine Klonbildungsfähigkeit der Zelltypen 3, 4, 5 und 6. Diese Beobachtungen werden durch Arbeiten von CONSCIENCE et al (1972) und VALENTI & KEHATY (1969) unterstützt, die die epithelialen Zellen des Fruchtwassers als nicht vital und unfähig zum Anwachsen beschreiben. Auch aus der in vitro Kultivierung anderer Zellen ist bekannt, daß differenzierte Epithelzellen im Gegensatz zu wenig differenzierten Zellen nicht zur metabolischen und morphologischen Anpassung an Kulturbedingungen in der Lage sind (FRANKS & WILSON 1977).

Der Zelltyp 2 steht demnach bezüglich seiner Morphologie sowie seiner Vitalität und Enzymatik zwischen

der Gruppe der epithelialen Zellen und dem weniger differenzierten Zelltyp 1. Seine Vitalität und Enzymaktivität sind wesentlich höher als bei den epithelialen Zelltypen, aber niedriger als beim Zelltyp 1. Ein klonales Wachstum des Zelltyps 2 erscheint jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen weniger wahrscheinlich, zumal ein direktes Anwachsen dieses Zelltyps nie beobachtet werden konnte.

Die Zahl der Solitärzellen in der Fruchtwasserzellkultur ist um den Faktor 3 bis 4 größer als die Zahl der Klone (3.3.2.a). Würde jede angewachsene Zelle einen Klon bilden, müßte die Zahl der Klone wesentlich größer sein, als sie tatsächlich zu beobachten ist (10 Klone/ml Fruchtwasser). Geht man wie UHLENDORF (1972) wegen der Uniformität der Klonzellen davon aus, daß jeder Klon aus einer einzigen Zelle entsteht, würden nur wenige angewachsene Solitärzellen Klone bilden können. Andererseits wäre auch denkbar, daß Klone aus mehreren angewachsenen Einzelzellen hervorgehen, wie dies von HAHNEMANN (1972) diskutiert wird. Schließlich könnten eng benachbarte angewachsene Einzelzellen passiv in einen Klonverband integriert werden. Da solche eng benachbarten Einzelzellen oft beobachtet wurden (Abb. 24, 25), könnten solche zellulären Mischklone durchaus häufig sein.

Geht man nach den vorliegenden Ergebnissen davon aus, daß nur ein einziger Zelltyp im Fruchtwasser die Fähigkeit zur Klonbildung besitzt, stellt sich die Frage, ob die verschiedenen epithelialen und fibroblastischen Klontypen (2.1.3.; Tab. 2) alle aus diesem einen Zelltyp entstehen können. Aus der vielfältigen Morphologie der Klone muß jedoch nicht zwangsläufig auf einen heterogenen Ursprung geschlossen werden, wie SCHMID (1973) es vermutet. Es ist auch

vorstellbar, daß sich die Klontypen aus dem Zelltyp 1 in vitro differenzieren.

Verschiedene Faktoren können bekanntermaßen die klonale Morphologie in der Zellkultur beeinflussen. So weiß man, daß die klonale Morphologie verschiedener Kulturen desselben Fruchtwassers in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Kulturmediums unterschiedlich sein kann (HOEHN et al 1974, MELANÇON et al 1971, SUTHERLAND et al 1974). Auch die Zelldichte in der Kultur spielt eine Rolle, wie Versuche an permanenten BALB/3T3 Zellinien zeigen, die ihre Morphologie bei Kontaktinhibition von fibroblastisch nach epithelial ändern (DI PAOLO 1972).

Durch eine getrennte Kultivierung der verschiedenen Fruchtwasserzelltypen könnte ein direkter Nachweis des Ursprungs der Klone erbracht werden. Erste Versuche hierzu führten CHANG et al (1981) durch. Durch Zentrifugation der Fruchtwasserzellen im Ficoll - Gradienten war eine Unterteilung der Fruchtwasserzellen in 3 Fraktionen möglich. CHANG et al fanden in den einzelnen Fraktionen unterschiedliche Vitalitätsraten mittels der Trypanblaumethode und unterschiedliche Klonbildungsraten und Mitoseindices der getrennt kultivierten Zellfraktionen. Eine dieser Fraktionen (F 3) weist eine besonders große Fähigkeit zur Klonbildung auf, was auf eine Anreicherung des Zelltyps 1 in dieser Fraktion zurückzuführen sein könnte. Allerdings waren die Klontypen in allen Fraktionen gleich, was bedeuten kann, daß gleichartige Klone aus verschiedenen Fruchtwasserzelltypen hervorgehen. Da jedoch der Zelltyp 1 eine gewisse Größenvariation zeigt, wäre es denkbar, daß sich dieser Zelltyp in allen 3 Ficoll - Fraktionen findet. Eine entsprechende Untersuchung wurde von CHANG et al nicht durchgeführt und würde eine Lösung dieses Problems erleichtern. Ebenso ist an eine Trennung der Zelltypen

vor der Kultivierung durch eine Mikropipette zu denken. Dieses Verfahren stößt jedoch wegen der erforderlichen großen Zahl der zu kultivierenden Zellen auf Schwierigkeiten.

Welchen starken Selektionsvorgängen die Fruchtwasserzellen während der ersten Woche der in vitro Kultivierung ausgesetzt sind, zeigen folgende Überlegungen und Zahlen, die sich unter anderem aus meinen Untersuchungen ergeben. Von den ca. 20000 Zellen/ml natives Fruchtwasser (Vitalitätsrate ca. 84 %) sind nach 7-tägiger in vitro Kultivierung nur noch etwa 30 % vital. Zu diesem Zeitpunkt besitzen durchschnittlich 23 % aller Fruchtwasserzellen Aktivität der Cytochromoxidase und 5 % der Fruchtwasserzellen Aktivität der Mg^{2+} ATPase. Dagegen sind durchschnittlich nur 0,2 % aller Fruchtwasserzellen anwachsende Solitärzellen, was etwa 35 Einzelzellen/ml Fruchtwasser entspricht. Die Zahl der Klone liegt mit ca. 10/ml Fruchtwasser am 7. Tag noch niedriger, was mit Werten aus der Literatur übereinstimmt (FELIX & DOHERTY 1979, KABACK & LEONARD 1972, NELSON & EMERY 1970, UHLENDORF 1970). In Relation zum Ausgangswert von 20000 Zellen/ml im nativen Fruchtwasser ist das eine bemerkenswert geringe Zahl. Diese Zahlen zeigen auch, daß nicht jede enzymatisch aktive Zelle oder gar jede vitale Zelle einen Klon bilden kann. Eine Verbesserung der Zellzuchtbedingungen ließe sich möglicherweise durch Zugabe wachstumsstimulierender Faktoren erreichen, die die Stoffwechsellage der Zellen verbessern und damit Anwachsen und Proliferation der klonbildenden Zellen begünstigen könnten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der vorliegenden Arbeit sollte das Verhalten der Fruchtwasserzellen unter Kulturbedingungen untersucht werden. Speziell waren die Untersuchungen so angelegt, daß auch die frühe Klonbildung analysiert werden konnte, da für die pränatale cytogenetische Diagnostik Zellklone aus nativen Fruchtwasserzellen benötigt werden.

Die morphologisch sehr heterogenen Fruchtwasserzellen wurden zunächst nach cytologischen Kriterien in 6 verschiedene Zelltypen eingeteilt, um systematische Vitalitätsanalysen und enzymcytochemische Nachweise zu ermöglichen. Diese Verfahren sowie die Kultivierung wurden mit Hilfe einer Mikropräparationstechnik durchgeführt und erforderten eine Vorbehandlung der Fruchtwasserzellen. Somit wurden zunächst die Auswirkungen von Aufbewahrungsbedingungen und Zentrifugation von Fruchtwasserzellen auf die Vitalität überprüft. Dabei ergaben sich praktische Hinweise für das weitere Vorgehen.

Meine Untersuchungen ergaben, daß der Zelltyp 1 (kleine runde Fruchtwasserzellen mit relativ großer Kern/Plasma - Relation) unter allen Zelltypen die höchste enzymatische Aktivität (Mg^{2+} ATPase, Cytochromoxidase) aufweist. Morphologisch entsprechende Zellen konnten zudem direkt beim Anwachsen am Boden des Kulturgefäßes beobachtet werden. Dieser Zelltyp 1 besitzt offensichtlich unter den gebräuchlichen Zellkulturbedingungen die besten Überlebens- und Lebensmöglichkeiten und ist wahrscheinlich Ursprung der nach einer Woche erstmals auftretenden Zellklone.

Vergleiche elektronenmikroskopischer Befunde des Zelltyps 1 (HAFEZ et al 1977, LUDWIG et al 1974,

VAN HERENDAEL et al 1978) und des Amnion reflectum (VAN HERENDAEL et al 1978) lassen morphologische Ähnlichkeiten erkennen. Lichtmikroskopisch läßt sich der Zelltyp 1 fetalen Peridermzellen zuordnen, die um die 16. Schwangerschaftswoche hohe metabolische und mitotische Aktivität aufweisen und ins Fruchtwasser abgestoßen werden (BUXMAN et al 1979, HOLBROOK 1979). Allerdings besitzen die Peridermzellen reichlich Glykogen, wie man es auch bei Fruchtwasserzellen des Typs 2 findet (HOYES 1968). Die Herkunft der Fruchtwasserzellen und speziell die des Zelltyps 1 ist nach den bisher vorliegenden Befunden nicht eindeutig geklärt. Weiterführende Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind daher wünschenswert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, W.A. — The localization of cytochrome C oxidase activity during mitochondrial specialization in spermiogenesis of prosobranch snails. J. Histochem. Cytochem. 18, 201-210 (1970)

ANDERSON, W.A., BARA, G., SELIGMAN, A.M. — The ultrastructural localization of cytochrome oxidase via cytochrome. J. Histochem. Cytochem. 23 (1), 13-20 (1975)

ANSELL, J.D. — The development of trophoblast in vitro from blastocysts containing varying amounts of inner cell mass. J. Embryol. exp. Morph. 33 (1), 177-185 (1975)

BISHOP, E.H., POLLOCK, T. — Fetal exfoliative cytology. Obstetrics and Gynecol. 35, 909-911 (1970)

BLACK, L., BERENBAUM, M.C. — Factors affecting the dye exclusion test for cell viability. Exp. Cell Res. 35, 9-13 (1964)

BONSNES, R.W. — The chemistry and physiology of amniotic fluid. In: DORFMAN, A. (ed), Antenatal diagnosis, pp. 3-16, University of Chicago Press, Chicago (1972)

BUXMAN, M.M., KOCARNIK, M.J., HOLBROOK, K.A. — Differentiation markers in fetal epidermis: Transglutaminase and Transpeptidase. The J. of investigative Dermatol 72, 171-177 (1979)

CASADEI, R., D'ABLAING, G., KAPLAN, B.J., SCHWINN, C.P. — A cytologic study of amniotic fluid. Acta Cytologica 17 (4), 289-298 (1973)

CHALUPA, M., HORKY, D.
Ultrastructure of the fetal membranes and origin of amniotic fluid. Gesk. Gynecol. 49 (1), 35-37 (1977)

CHANG, H.-C., JONES, O.W., BRADSHAW, C., SARKAR, S., PORRECO, R.P.
Enhancement of human amniotic cell growth by ficoll - paque gradient fractioation. In Vitro 17, 81-90 (1981)

CHIGBUH, A.E.
Volume, origin and circulation of amniotic fluid. Ann. Ostet. Ginecol. Med. Perinat. 94 (5), 373-381 (1973)

CLAUSSEN, U., TERINDE, R., RÖHRBORN, G., BECK, L.
Pränataldiagnostik in der Frühschwangerschaft. Rheinisches Ärzteblatt 20, (1978)

CONSCIENCE, J.F., SCHMID, W., GYSEL, J., STAMM, H., SCHREINER, W.
Gewebekultur von Amnionzellen aus Fruchtwasserproben der frühen Schwangerschaft. Technische Erfahrungen und zytogenetische Resultate. Arch. Genet. (Zür.) 45 (1), 17-26 (1972)

DALLAIRE, L., MORIN-GONTHIER, M., POTIER, M., MELANÇON, S.B.
Prenatal diagnosis: data on the cell viability and alpha - fetoproteins of the amniotic fluid. Union Med. Can. 104 (12), 1782-1786 (1975)

DAVIDSON, R.G.
Problems in the applicatien of cell culture to human genetics. Birth defects 10 (15), 14-18 (1974)

DFG - Studie
Informationsblatt über die Dokumentation der Untersuchungen im Rahmen des Schwerpunktprogrammes "Pränatale Diagnostik genetisch bedingter Defekte" der Deutschen Forschungsgemeinschaft, München.

14. Informationsblatt (1979)
15. Informationsblatt (1981)
16. Informationsblatt (1982)

DI PAOLO, J.A. — Quantitation of chemically induced neoplastic transformation of BALB/3T3 cloned cell lines. Cancer Res. 32, 2686-2695 (1972)

ERECIŃSKA, M., WILSON, D.F. — Cytochrome C oxidase: a synopsis Arch. Biochem. Biophys. 188 (1), 1-14 (1978)

FELIX, J.S., DOHERTY, R.A. — Amniotic fluid cell culture II. Evaluation of a red blood cell lysis procedure for culture of cells from blood-contaminated amniotic fluid. Clin. Genet. 15 (3), 215-220 (1979)

FIRTH, J.A. — Cytochemical approaches to the localization of specific adenosine triphosphatases. Histochem. J, 10 (3), 253-269 (1978)

FLOYD, W.S., GOODMAN, P.A., WILSON, A. — Amniotic fluid filtration and cytology. Obstet. Gynecol. 34, 583-591 (1969)

FRANKS, L.M., WILSON, P.D. — Origin and ultrastructure of cells in vitro. Int. Rev. Cytol. 48, 55-139 (1977)

GEBAUER, H.-J. — Pränatale Genetische Diagnostik durch Fruchtwasseruntersuchungen. Niedersächs. Ärzteblatt 11, 365-367 (1978)

GEYER, G. — Ultrahistochemie. G. Fischer Verlag, Stuttgart pp. 121-129, 163-179, 395, 432-436 (1973)

GOSDEN, M.
Amniotic fluid cell cytology and cytogenetics.
In: SANDLER, M. (ed.), Amniotic fluid and its clinical significance, pp. 37-112, Marcel Dekker,INC, New York/Basel (1981)

GOSDEN, C., BROCK, D.J.H.
Combined use of alphafetoprotein and amniotic fluid cell morphology in early prenatal diagnosis of fetal abnormalities.
J. Med. Genet. 15 (4), 262-270 (1978)

GREENE, A.E., TOJI, L., NICHOLS, W.W., CORIELL, L.L.
Amniocentesis cells: culture, cryogenic storage, isozymes and finite life in vitro.
In Vitro 9 (3), 156-159 (1973)

HAFEZ, E.S.E., FADEL, H.E., NOONAN, S.M., OSHIMA, M., OKAMURA, H., WATSON, J.H.L., ZANEFELD, L.J.D., STEGER, R.W.
Scanning electron microscopy of human femal reproductive tract and amniotic fluid cells.
Int. J. Fertil. 22 (4), 193-205 (1977)

HAHNEMANN, N.
Possibility of culturing foetal cells at early stages of pregnancy.
Clin. Genetics 3 (4), 286-293 (1972)

HANKS, J.H., WALLACE, J.H.
Determination of cell viability.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 98, 188-192 (1958)

HASHOLT, L.
Behaviour of cell cultures from human amniotic fluid.
J. Med. Genet. 13 (1), 34-37 (1976)

HOEHN, H., BRYAN, E.M., KARP, L.E., MARTIN, G.M.
Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential.
Pediatr. Res. 8 (8), 746-754 (1974)

HOEHN, H., BRYANT, E.M., KARP, L.E., MARTIN, G.M.
Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. II. Cytogenetic parameters as functions of clonal type and preparative technique.
Clin. Genet. 7 (1), 29-36 (1975)

HOEHN, H., BRYANT, E.M., FANTEL, A.G., MARTIN, G.M.
Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. III. The fetal urine as a potential source of clonable cells.
Humangenetik 29 (4), 285-290 (1975)

HOEHN, H., RODRIGUEZ, M.L., NORWOOD, T.H., MAXWELL, C.L.
Mosaicism in amniotic fluid cell cultures: Classification and significance.
Amer. J. of Med. Genet. 2, 253-266 (1978)

HOLBROOK, K.
Human epidermal embryogenesis.
Int. J. of Dermatol. 18, 329-356 (1979)

HOYES, A.D.
Ultrastructure of the cells of the amniotic fluid.
J. Obstet. Gynaecol. Brit. Comm. 75, 164-171 (1968)

HÜNDGEN, M.
Der Einfluß verschiedener Aldehyde auf die Strukturerhaltung gezüchteter Zellen und auf die Darstellbarkeit von vier Phosphatasen.
Histochemie 15, 46-61 (1968)

HÜNDGEN, M. — Potential and limitation of enzyme histochemistry: Studies of the intracellular digestive apparatus of cells in tissue culture. In: BOURNE, G.H. et al (eds.), Int. rev. cytol. (1977)

HUISJES, H.J. — Origin of the cells in liquor amnii. Am. J. Obstet. Gyn. 106, 1222 (1970)

HULTBERG — Molecular forms and activities of glycosidases in cultures of amniotic fluid cells. Biochem. J. 155, 599-605 (1976)

KABACK, M.M., LEONARD, C.O. — Morphological and enzymological considerations in antenatal diagnosis. In: DORFMAN, A. (ed.), Antenatal diagnosis, The University of Chicago Press (1972)

KALINA, M., PEARSE, A.G.E. — Ultrastructural localization of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase complexes on the mitochondrial cristal membrane; a cytochemical study. VII. Internat. Congress EM, Grenoble 3, 133-134 (1970)

KNOERR-GÄRTNER, H., HAERLE, I. — A modified method of culturing human amniotic fluid cells for prenatal detection of genetic disorders. Humangenetik 14 (4), 333-334 (1972)

KOENIG, C.S., VIAL, J.D. — A critical study of the histochemical lead method for localization of Mg - ATPase at cell boundaries. Histochem. J. 5, 503-518 (1973)

LIND, T., PARKIN, F.M., CHEYNE, G.A.
Biochemical and cytological changes in liquor amnii with advancing gestation.
J. Obst. Gynaecol. Brit. Comm. 76, 673-683 (1969)

LIND, T.
The role of the fetus in the formation of amniotic fluid.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm. 79, 289-298 (1972)

LUDWIG, H., METZGER, H., KORTE, M., WOLF, H.
The internal surface of the amniotic epithelium. A scanning electron microscopic study.
Arch. Gynaecol. 217 (2), 141-154 (1974)

MARCHANT, G.S.
Evaluation of methods of amniotic fluid cell culture.
Am. J. Med. Technol. 37 (10), 391-396 (1971)

MELANÇON, S.B., LEE S.Y., NADLER, H.L.
Histidase activity in cultivated human amniotic fluid cells.
Science 173, 627-628 (1971)

MERCHANT, D.J., KAHN, R.H., MURPHY, W.H.
Handbook of cell and organ culture, 2nd edition, Minneapolis (1960)

NADLER, H.L.
Prenatal detection of genetic defects.
J. Pediat. 74, 132-143 (1969)

NADLER, H.L., GERBIE, A.
Present status of amniocentesis in intrauterine diagnosis of genetic defects.
Obst. and Gynecol. 38 (5), 789-799 (1971)

NADLER, H.L.
Prenatal detection of genetic disorders.
In: Advances in Human Genetics 3, pp. 1-37 (1972)

NELSON, M.M., EMERY, A.E.H. — Amniotic fluid cells; prenatal sex prediction and culture. Brit. med. J. I, 523-526 (1970)

NELSON, M.M. — Antenatal sex determination. In: EMERY, A.E.H. (ed.), Churchill Livingstone (1973)

NELSON, M.M. — Amniotic fluid cell culture and chromosome studies. In: EMERY, A.E.H. (ed.), Churchill Livingstone (1973)

OTA, D.M. — The use of histidase for the study of amniotic cell origin and histidinemia. Am. J. Obstet. Gynecol. 117 (4), 567-571 (1973)

PEAKMAN, D.C., MORETON, M.F., ROBINSON, A. — Prenatal diagnosis: techniques used to help in ruling out maternal cell contamination. J. Med. Genet. 14 (1), 37-39 (1977)

PEARSE, A.G.E. — Histochemistry Vol. 1, 3rd Edition, pp. 526-531, 720-721 (1968)

PRIEST, R.E., MARIMUTHU, K.M., PRIEST, J.H. — Origin of cells in human amniotic fluid cultures, ultrastructural features. Lab. Invest. 39 (2), 106-109 (1978)

SCHMIDT, W. — Die pränatale Diagnose von Chromosomenanomalien. Triangel 11 (3) (1973)

SELIGMAN, A.M., KARNOVSKY, M.J., WASSERKRUG, H.L., HANKER, J.S. — Non droplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB) J. Cell Biol. 38, 1-14 (1968)

SELIGMAN, A.M., PLAPINGER, R.E. — Comparison of the ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with three bis (phenylenediamines). Histochemie 23, 63-70 (1970)

SHAW, R.E., MARRIOTT, H.J. — The origin of amniotic fluid and the bearing on this problem of foetal urethral atresia. J. Obstet Gynaec. Brit. Emp. 56, 1004-1009 (1949)

STEELE, M.W., BREG, W.R. — Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. Lancet I, 383-385 (1966)

SUN, A.S., AGGARWAL, B.B., PACKER, L. — Enzyme levels of normal human cells: aging in culture. Arch. Biochem. Biophys. 170 (1), 1-11 (1975)

SUTHERLAND, G.R., BAIN, A.D. — Culture of cells from the urine of new born children. Nature 239, 231 (1972)

SUTHERLAND, G.R., BAULD, R., BAIN, A.D. — Observations on human amniotic fluid cell strains in serial culture. J. Med. Genet. 11 (2), 190-195 (1974)

THERKELSEN, A.J. — Cultures of cells from amniotic fluid. In: BOUÉ, A. (ed.), Prenatal diagnosis, pp. 55-66, Paris, Inserm, (1976)

UHLENDORF, B.W. — Use of amniotic fluid and reliability of diagnostic procedures. Early diagnosis of human genetic defects. In: HARRIS, M. (ed.), Fogarty Int. Center Proc. 6, pp. 149-168, New York Acad. Press (1970)

VALENTI, C., KEHATY, T. Culture of cells obtained by amniocentesis. J. Lab. Clin. Med. 73, 355-358 (1969)

VAN DER VEER, E., KLEIJER, W.J., DE JOSSELIN DE JONG, J.E., GALJAARD, H. Lysosomal enzyme activities in different types of amniotic fluid cells. Hum. Genet. 40, 285-292 (1978)

VAN HERENDAEL, B.J., OBERTI, C., BROSENS, I. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission and scanning electron microscopic study. Am. J. Obstet. Gynecol. 131 (8), 872-880 (1978)

VAN LEEUWEN, L., JACOBY, H., CHARLES, D. Exfoliative cytology of amniotic fluid. Acta Cytol. 9, 442-445 (1965)

VOTTA, R.A., DE GAGNETEN, C.B., PARADA, O., GIULIETTI, M. Cytologic study of amniotic fluid in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 102, 571-577 (1968)

WACHSTEIN, M., MEISEL, E. Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. Am. J. Clin. Path. 27, 13-23 (1957)

WACHSTEIN, M., BESEN, B. Electron microscopic localization of phosphatase activity in the trush border of the rat kidney. J. Histochem. Cytochem. 11, 447-448 (1963)

WACHSTEIN, M., FERNANDEZ, C. Electron microscopic localization of nucleoside triphosphatase in endoplasmic reticulum of liver and pancreas. J. Histochem. Cytochem. 12, 40-42 (1964)

WACHTEL, E., GORDON, H., OLSEN, E. — Cytology of amniotic fluid. J. Obstet. Gynaecol. Brit. Comm 76, 596-602 (1969)

WAHLSTRÖM, J., BROSSET, A., BARTSCH, F. — Viability of amniotic cells at different stages of gestation. Lancet II, 1037 (1970)

WAHLSTRÖM, J. — The quantity of viable cells at various stages of gestation. Humangenetik 22 (4), 335-342 (1974)

ZIMMERMANN, H.-P. — Localization of nucleoside triphosphatases on chromosomes of HeLa cells. Cytobiologie 16, 91-97 (1977)

7. ANHANG (Tabellen und Abbildungen)

Tab. 1: Zelltypen im menschlichen Fruchtwasser

ZELL-TYP	MORPHOLOGIE	GRÖSSE	CYTOPLASMA	KERN	KERN/PLASMA RELATION	SCHEMA	ABB.
1	rund, einzeln oder in Gruppen "parabasal"	15 µm bis 35 µm	multiple Vakuolen	zentral oder exzentrisch 7-12 µm	ca. 1:3		4a 4b 4c 12 13
2	polygonal bis ovoid "intermediate"	35 µm bis 50 µm	durchsichtig oder leicht dicht, evtl. Vakuolen	vesikulär, granuläres Chromatin 6-9 µm	ca. 1:10		5 12 13
3	polygonal bis zylindrisch "cornified" "superficial"	20 µm bis 50 µm	durchsichtig, evtl.Granula, Zellmembran gefältelt	pyknotisch 3-5 µm	ca. 1:25		6 12 13
4	polygonal bis ovoid "anucleated"	20 µm bis 50 µm	durchsichtig, evtl.Granula, Zellmembran gefältelt	fehlt oder Kerntrümmer			7 12 13
5	mosaikartige Anordnung polyedrischer Zellen "amniotic"		blasig	irregulär			8
6	unregelmäßige Anordnung von Zellen mit unscharfen Zellgrenzen "amniotic"			syncytial			9

Tab.2 : Zellklone in der Fruchtwasserzellkultur

	Morphologie
Solitärzelle	am Boden des Kulturgefäßes anwachsende Einzelzelle; heterogene Form: fibroblastisch oder rund mit Cytoplasmafortsätzen (Abb. 23,24 und 25)
früher Klon	Klon, der aus maximal 4 Zellen besteht; oft noch nicht eindeutig als E- oder F - Klon zu erkennen (Abb. 26)
E - Klon	E_1, E_2 und AF - Klone wurden für die Auswertung zu E - Klonen zusammengefaßt. Zellkolonie aus epitheloiden, pleomorphen, großen Zellen mit großen Zellkernen und engem Zellkontakt; eventuell Mehrkernigkeit, eventuell Wachstum in"Inselform" (Abb.28).
F - Klon	Zellkolonie aus fibroblastischen, spindelförmigen, uniformen Zellen mit kleinen Zellkernen und langen Cytoplasmafortsätzen (Abb. 27).

Tab.3 : Prozentualer Anteil der enzymatisch aktiven Fruchtwasserzellen der Typen 1 und 2 an allen Zellen des entsprechenden Zelltyps

Mg^{2+}ATPase

Tag		0	1	2	3	4	5	6	7	
Zelltyp	1	9,2	14,2	12,5	13,7	10,7	11,3	10,7	10,2	%
	2	2,8	3,6	2,5	2,1	2,2	2,1	0	1,3	%

Cytochromoxidase

Tag		0	1	2	3	4	5	6	7	
Zelltyp	1	2,1	2,2	5,5	3,2	27,5	18,2	17,7	41,0	%
	2	0,8	0,4	0,6	0,4	4,3	1,1	4,2	12,4	%

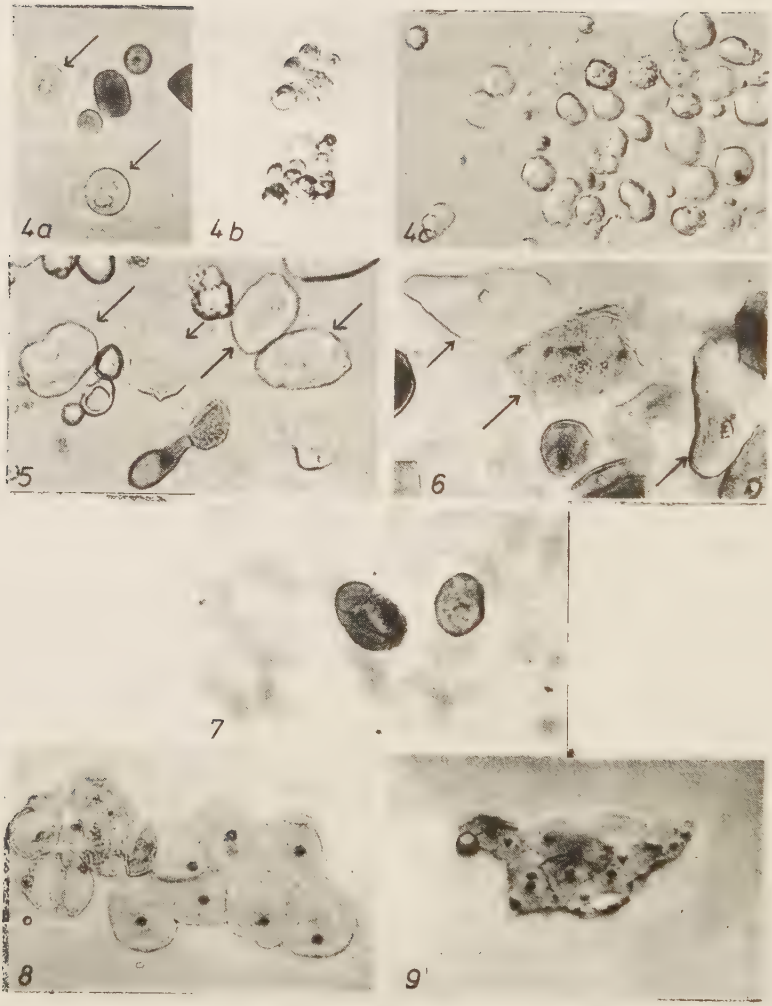


Abb. 4 - 9: Zelltypen im nativen menschlichen Fruchtwasser

Abb. 4 a : Zelltyp 1, einzeln (Pfeile)
Abb. 4 b,c: Zelltyp 1, in Gruppen
Abb. 5 : Zelltyp 2 (Pfeile)
Abb. 6 : Zelltyp 3 (Pfeile)
Abb. 7 : Zelltyp 4, zwei Zellen, trypanblau - positiv
Abb. 8 : Zelltyp 5
Abb. 9 : Zelltyp 6, trypanblau - positiv

Vergrößerung ca. 150-fach

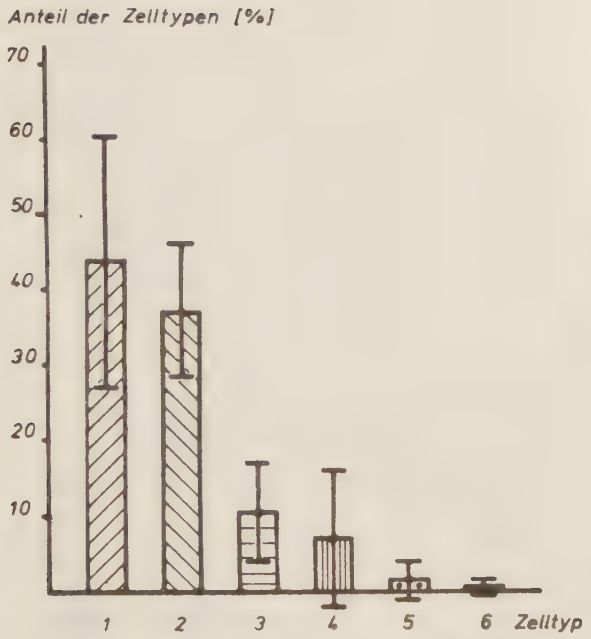


Abb. 10: Prozentuale Häufigkeit der 6 verschiedenen Zelltypen im nativen menschlichen Fruchtwasser (n = 50)

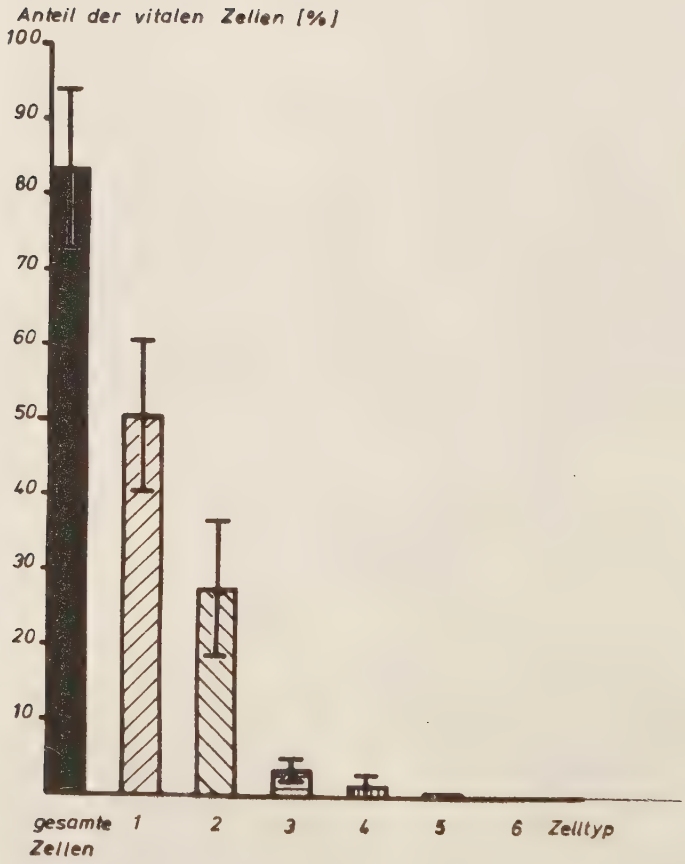


Abb. 11: Vitalität der 6 verschiedenen Zelltypen im nativen Fruchtwasser (n = 8)

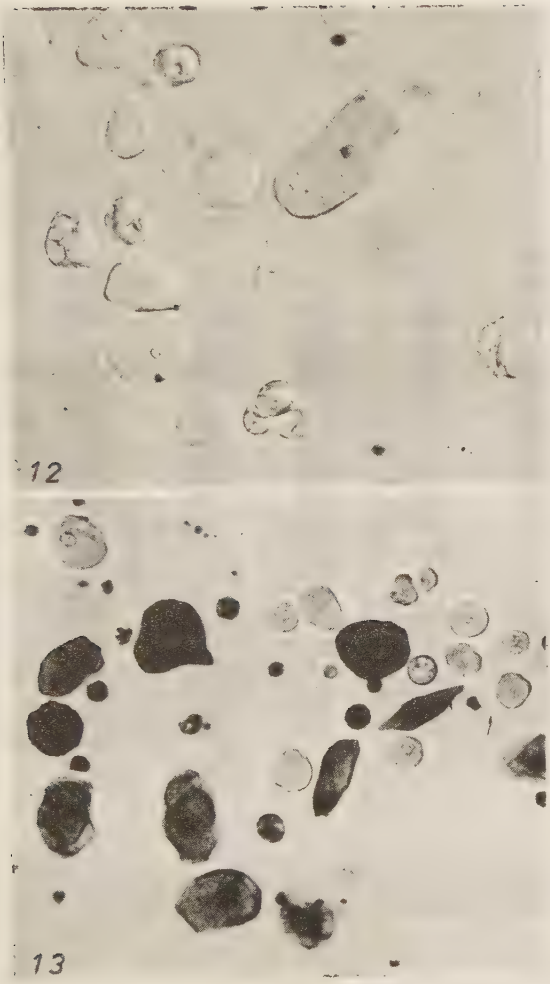


Abb. 12 und 13: Vitalitätsuntersuchungen an Fruchtwasserzellen mit Trypanblau

Abb. 12 : native Fruchtwasserzellen

Abb. 13 : Fruchtwasserzellen nach 48-stündiger Kultivierung
Nicht - vitale Zellen sind dunkel gefärbt, lebende Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau nicht auf. Der Prozentsatz der toten Zellen steigt mit der Dauer der Kultivierung an.

Vergrößerung ca. 150-fach

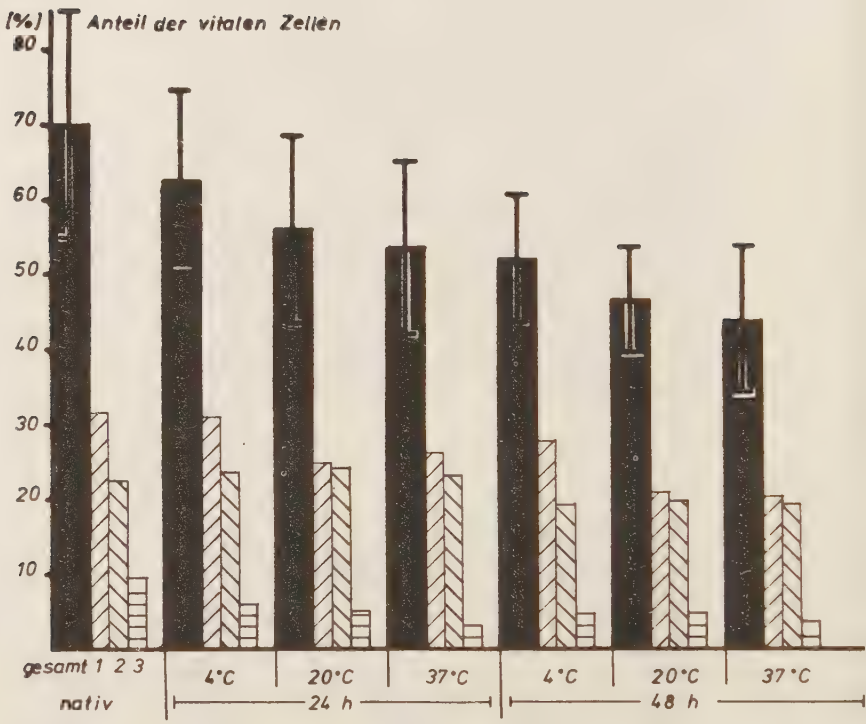


Abb. 14: Vitalität von Fruchtwasserzellen nach 24 h und 48 h Aufbewahrung bei 4°C, 20°C und 37°C (n = 13)

gesamte Fruchtwasserzellen

Zelltyp 1

Zelltyp 2

Zelltyp 3

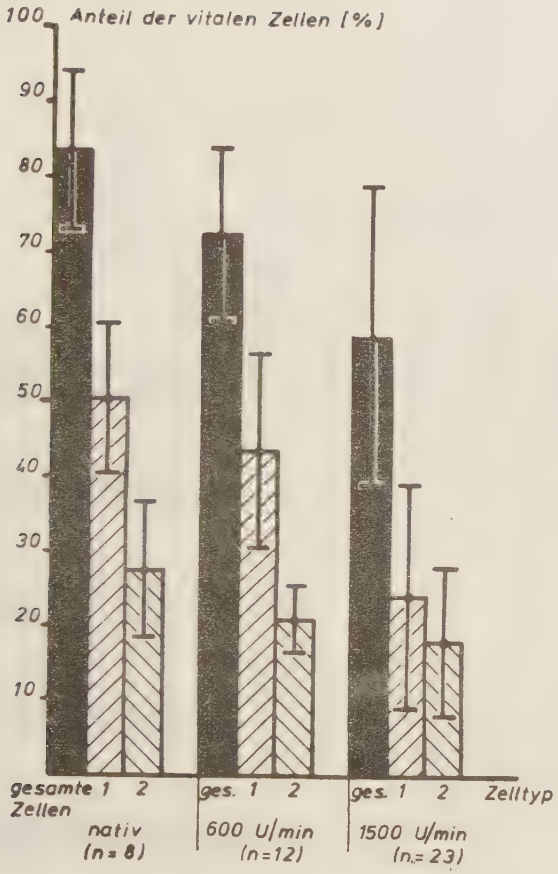
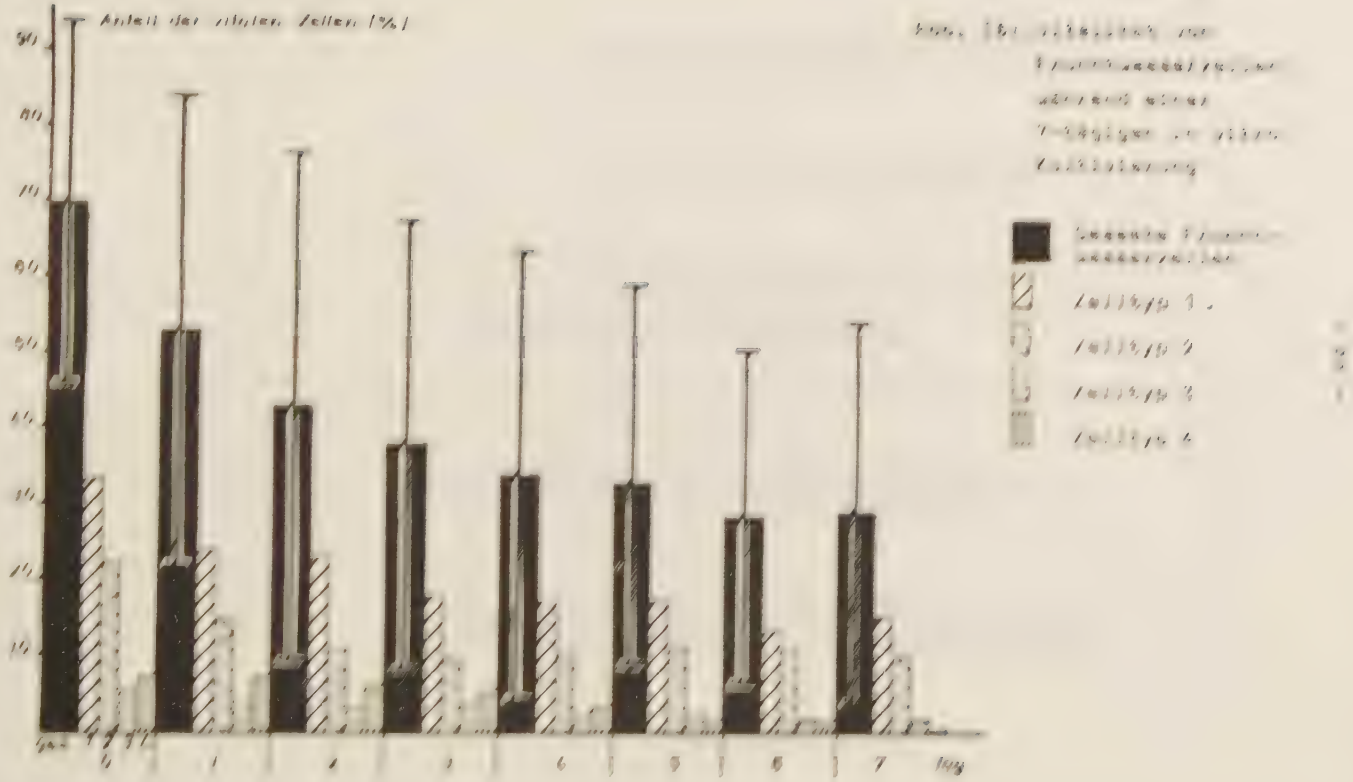


Abb. 15: Vitalität nativer Fruchtwasserzellen nach Zentrifugation bei 600 U/min und 1500 U/min


Anteil der zitalen Zellen (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
Tage

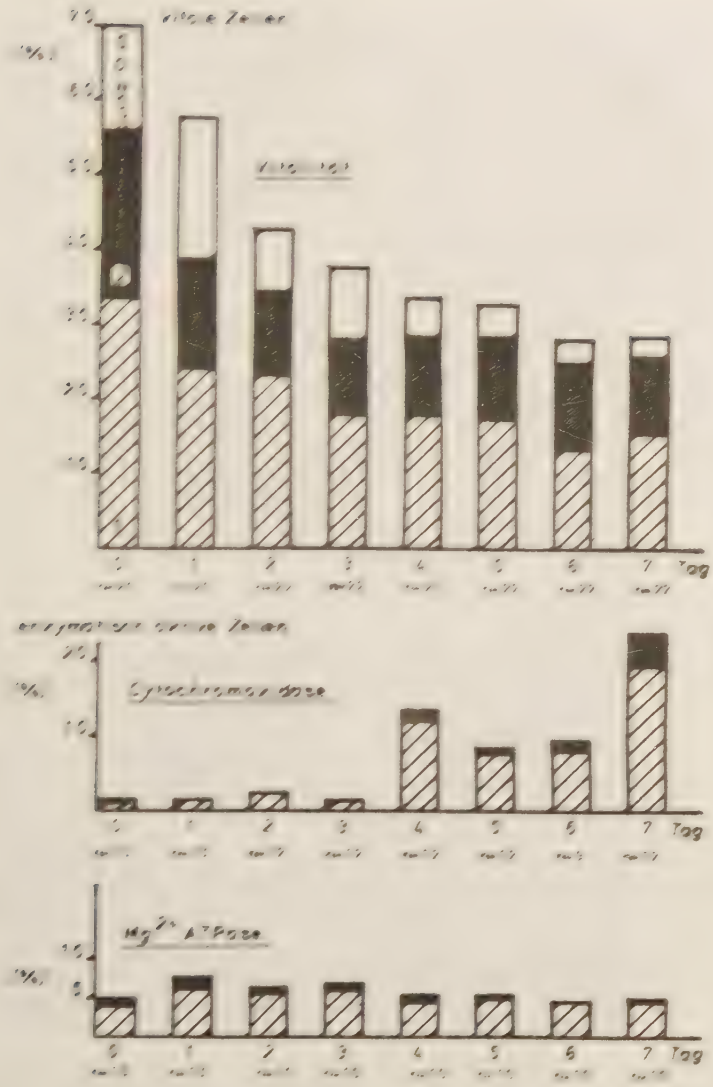


Abb. 17: Vitalität und Cytochromoxidase- sowie Mg^{2+} ATPase-Aktivität von Fruchtwasserzellen im Verlauf einer 7-tägigen in vitro Kultivierung

Zelltyp 1

Zelltyp 2

sonstige Zelltypen

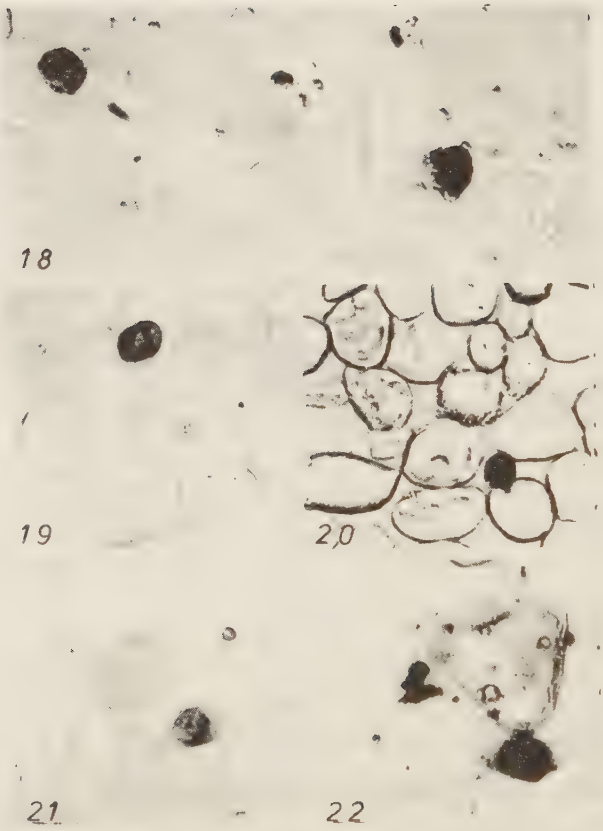


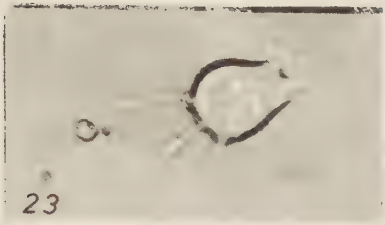
Abb. 18: 2 Zellen des Typs 1 mit Mg^{2+} ATPase - Aktivität nach 2-tägiger Kultivierung; ca. 250 -fach

Abb. 19: Zelltyp 1 mit Mg^{2+} ATPase - Aktivität nach 3-tägiger Kultivierung; ca. 250 -fach

Abb. 20: Zelltyp 1 mit Mg^{2+} ATPase - Aktivität nach 2-tägiger Kultivierung; ca. 150 -fach

Abb. 21: anwachsende Solitärzelle mit Cytochromoxidase - Aktivität, die Zelle entspricht morphologisch dem Zelltyp 1; daneben enzymatisch inaktiver Zelltyp 2; 5. Kulturtag, ca. 250 -fach

Abb. 22: anwachsende Solitärzelle, die morphologisch dem Zelltyp 1 entspricht, starke Aktivität der Cytochromoxidase; 5. Kulturtag, ca. 250 -fach



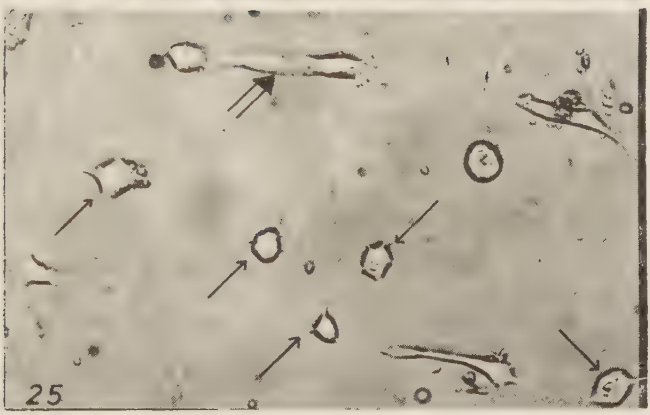


Abb. 23: anwachsende Solitärzelle, die morphologisch dem Zelltyp 1 entspricht, 5. Kultivierungstag, ca. 250-fach

Abb. 24: mehrere anwachsende Solitärzellen mit morphologischer Ähnlichkeit zum Zelltyp 1 (Pfeile), früher Klon (⇒), 7. Kultivierungstag, ca. 250-fach

Abb. 25: mehrere anwachsende Solitärzellen mit morphologischer Ähnlichkeit zum Zelltyp 1 (Pfeile), früher Klon (⇒), 7. Kultivierungstag, ca. 150-fach

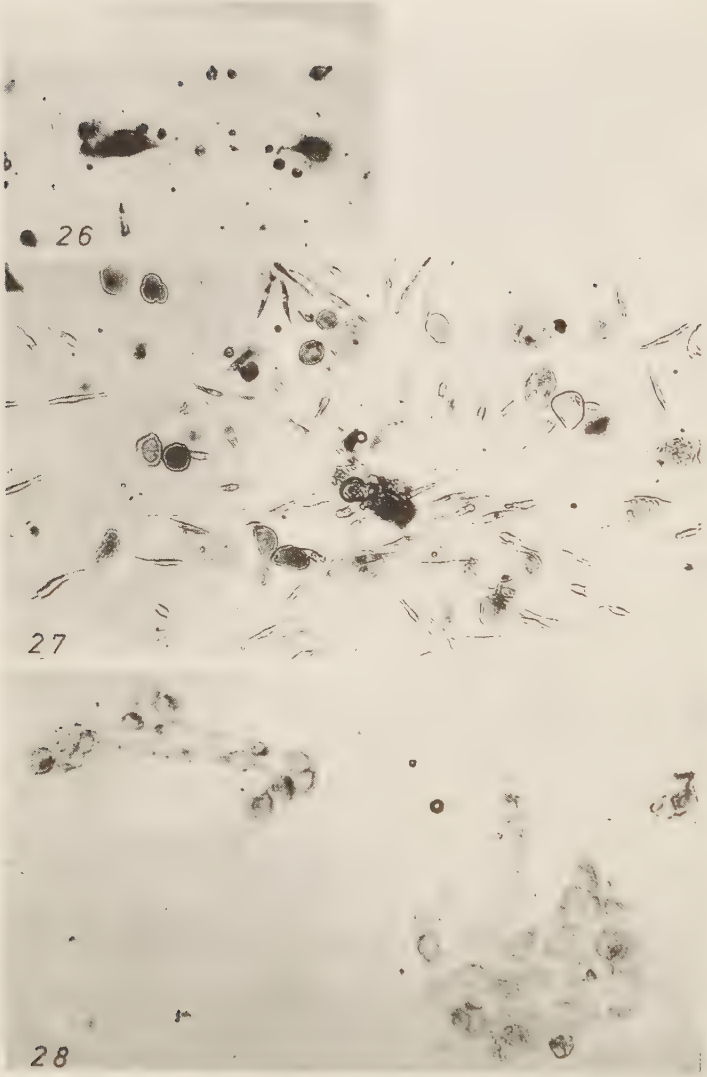


Abb. 26: früher Klon mit starker Cytochromoxidase - Aktivität, 5. Kultivierungstag, ca. 150-fach

Abb. 27: F - Klon; dazwischen frei schwimmende, mit Trypanblau gefärbte Fruchtwasserzellen, 7. Kultivierungstag, ca. 150-fach

Abb. 28: E - Klone mit Cytochromoxidase - Aktivität, 7. Kultivierungstag, ca. 150-fach

Erläuterung der verwendeten Abkürzungen:

Abb.:	Abbildung
ADP:	Adenosindiphosphat
ATP:	Adenosintriphosphat
Mg^{2+} ATPase:	Magnesium - abhängige Adenosintriphosphatase
DAB:	Diaminobenzidin
DFG:	Deutsche Forschungsgemeinschaft
SSW:	Schwangerschaftswoche
Tab.:	Tabelle
U/min:	Umdrehungen/min

Herrn Prof. Dr. G. Röhrborn danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.J. Gebauer für seine wertvollen Anregungen, seine Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und für seine freundliche Gesprächsbereitschaft.

Ebenso danke ich der Frauenklinik der Universität Düsseldorf unter Prof. Dr. L. Beck für die Bereitstellung der Fruchtwasserproben.

Auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf, die mir bei der Arbeit wertvolle Hinweise gegeben haben, bin ich zu Dank verpflichtet.

Meiner Frau Brigitta danke ich für ihr Verständnis und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

2.8.1957	Geboren in Wuppertal als Sohn der Eheleute Georg und Hildegard Mende
1964 - 1967	Besuch der kath. Grundschule Hombüchel in Wuppertal
1967 - 1976	Besuch des neusprachlich-naturwissenschaftlichen Gymnasium Süd in Wuppertal
Juni 1976	Reifeprüfung
Okt. 1976	Aufnahme des Studiums der Medizin an der Universität Düsseldorf
Aug. 1978	Ablegen der ärztlichen Vorprüfung
Aug. 1979	Ablegen des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
Aug. 1981	Ablegen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
1981 - 1982	Praktisches Jahr im Lukaskrankenhaus in Neuss
Okt. 1982	Ablegen des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
22.11.1982	Zuteilung der Approbation als Arzt
Jan. 1983	Beginn des Grundwehrdienstes als Truppenarzt in Düsseldorf
Nov. 1983	Beginn der Weiterbildung zum Arzt für Frauenheilkunde am St.Josef Krankenhaus in Haan

Copy + Sofortdruck GmbH
Bilker Allee 173 Telefon 0211/317020

Copy + Sofortdruck GmbH
Bilker Allee 173 Telefon 0211/317020